

Aus dem Institut
für Virologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Etablierung eines Zellkultursystems
zur Isolierung hochvirulenter Stämme
des Virus der infektiösen Bursitis (IBDV)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Olga Zenkina
aus Korkino/Russland

Leipzig, 2009

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Prof. Dr. Hermann Müller

Gutachter: Prof. Dr. Hermann Müller
Institut für Virologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns
Klinik für Vögel und Reptilien
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Silke Rautenschlein
Klinik für Geflügel
Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 23.06.2009

Wer sein Ziel kennt, findet den Weg.

Meinen Eltern und meiner Familie

Inhaltverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Einleitung / Literaturübersicht | 1 |
| 1.1 | Das Virus der Infektiösen Bursitis | 1 |
| 1.1.1 | Geschichtlicher Überblick und Taxonomie | 1 |
| 1.1.2 | Evolution des Erregers, Einteilung in Sero- und Pathotypen | 2 |
| 1.1.3 | Virusstruktur | 4 |
| 1.1.4 | Replikation von IBDV <i>in vitro</i> | 6 |
| 1.2 | Infektiöse Bursitis | 8 |
| 1.2.1 | Epidemiologie | 8 |
| 1.2.2 | Pathogenese | 8 |
| 1.2.3 | Klinik | 10 |
| 1.2.4 | Diagnose | 11 |
| 1.2.5 | Differentialdiagnose | 12 |
| 1.3 | Die Chorioallantoismembran (CAM) | 13 |
| 1.3.1 | Physiologische Bedeutung der CAM | 13 |
| 1.3.2 | Entstehung der CAM | 14 |
| 1.3.3 | Blutfluss | 14 |
| 1.3.4 | Bedeutung des CAM-Modells | 15 |
| 1.4 | Epithelzellen <i>in vitro</i> | 16 |
| 1.4.1 | Züchtung der Epithelzellen (allgemeine Grundlagen) | 17 |
| 1.4.2 | Phänotyp-Bestimmung | 19 |
| 1.5 | Ziele der Arbeit | 20 |
| 2 | Material und Methoden | 22 |
| 2.1 | Material | 22 |
| 2.1.1 | Geräte | 22 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterial | 22 |
| 2.1.3 | Embryonierte Hühnereier | 23 |
| 2.1.4 | Viren | 23 |
| 2.1.5 | Enzyme | 23 |
| 2.1.6 | Molekulargewichtsmarker | 24 |
| 2.1.6.1 | DNA-Längenstandard λ dV1/PAT | 24 |
| 2.1.6.2 | DNA-Längenstandard λ HaeIII | 24 |
| 2.1.6.3 | Biotinylierter Molekulargewichtsmarker für Proteine | 24 |
| 2.1.7 | Antikörper | 25 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1.7.1 | Zellspezifische Antikörper | 25 |
| 2.1.7.2 | Anti-IBDV-Antikörper | 25 |
| 2.1.7.3 | Anti-Spezies-Antiseren | 25 |
| 2.1.8 | Oligonukleotide für die RT-PCR | 26 |
| 2.1.9 | Vorgefertigte Systeme ("Kits") | 26 |
| 2.1.10 | Lösungen, Puffer und Medien | 26 |
| 2.2 | Methoden | 27 |
| 2.2.1 | Zellkulturen | 27 |
| 2.2.1.1 | HEF-Zellkultur | 27 |
| 2.2.1.2 | Hühner-Embryo-Leberzellen (HEL-Zellen) | 27 |
| 2.2.1.3 | CAM-Epithelzellen | 28 |
| 2.2.1.4 | Proliferationsdynamik der CAM-Epithelzellen | 29 |
| 2.2.1.5 | Charakterisierung der CAM-Zellkultur | 29 |
| 2.2.2 | Herstellung der Saatviren von Cu-1 und BD-3/99tc | 30 |
| 2.2.3 | Plaquetest | 30 |
| 2.2.4 | Anzüchtung von hv-IBDV-Isolaten in Eiern | 30 |
| 2.2.5 | Ermittlung der PBE/ml und der EID ₅₀ infektiöser Materialien | 31 |
| 2.2.6 | Anzüchtung von IBDV in HEF-Kulturen, HEL-Kulturen und in CAM-Epithelzellen | 32 |
| 2.2.7 | Extraktion der viralen RNA aus den infizierten Materialien | 32 |
| 2.2.8 | Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) | 32 |
| 2.2.9 | Nachweis von DNA durch Agarose-Gel-Elektrophorese | 33 |
| 2.2.10 | Reinigung von DNA-Fragmenten (Gene Clean) | 33 |
| 2.2.11 | Klonierung von DNA | 33 |
| 2.2.11.1 | Ligation | 34 |
| 2.2.11.2 | Transformation mittels TA-cloning Kit | 34 |
| 2.2.12 | Restriktionsenzymanalyse (REA) | 34 |
| 2.2.13 | Nachweis von Proteinen | 35 |
| 2.2.13.1 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) | 35 |
| 2.2.13.2 | Western blot | 35 |
| 2.2.13.3 | Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) | 36 |
| 2.2.13.4 | Nachweis viraler Antigene mittels Immunhistochemie (IHC) | 36 |
| 2.2.14 | Charakterisierung der Zellkulturen mittels Durchflusszytometrie | 37 |
| 3 | Ergebnisse | 38 |
| 3.1 | Etablierung einer Zellkultur aus der CAM von Hühnereiern | 38 |
| 3.1.1 | Nachweis der keratinhaltigen Zellen in der CAM | 38 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.2 | Auswahl des Digestionsverfahrens | 39 |
| 3.1.3 | Expression von Zytokeratin und Vimentin in frisch isolierten CAM-Epithelzellen | 41 |
| 3.1.3.1 | Nachweis von Zytokeratin und Vimentin mittels Western blot | 41 |
| 3.1.3.2 | FACS-Analyse der entstandenen Zellsuspension | 42 |
| 3.1.4 | Optimierung des epithelspezifischen Mediums | 45 |
| 3.1.4.1 | Auswirkung des Ca^{2+} -Gehaltes auf die Adhäsionsfähigkeit der CAM-Epithelzellen | 45 |
| 3.1.4.2 | Optimierung der Zusatzstoffe | 46 |
| 3.1.5 | Zelltypbestimmung | 49 |
| 3.1.5.1 | Expression von Zytokeratin und Vimentin in vitro | 49 |
| 3.1.5.2 | Zellmorphologie | 51 |
| 3.1.5.3 | IIFT zum Nachweis von Zytokeratin und Vimentin in vitro | 51 |
| 3.1.6 | HEL-Kultur | 52 |
| 3.1.7 | Fazit 1 | 53 |
| 3.2 | Generierung infektiöser Nachkommen in embryonierten Hühnereiern | 54 |
| 3.2.1 | Nachweis viraler Antigene in der CAM | 55 |
| 3.2.2 | Nachweise des Virusantigens im infektiösen Material | 56 |
| 3.2.2.1 | Pathologisch-anatomische Veränderungen der Embryonen | 56 |
| 3.2.2.2 | Nachweis viraler Antigene mittels Immunhistochemie | 58 |
| 3.2.2.3 | Titerbestimmung des infektiösen Materials | 59 |
| 3.2.3 | Darstellung der viralen Strukturproteine im Western blot | 61 |
| 3.2.4 | Bestimmung des Genoms mittels RT-PCR und RE-Analyse des PCR-Produktes nach den Eipassagen | 63 |
| 3.2.5 | Fazit 2 | 64 |
| 3.3 | Voruntersuchung der CAM-Epithelzellen und der HEL-Zellen zur Feststellung der Replikation von IBDV in vitro (Stämme Cu-1, BD-3/99tc) | 65 |
| 3.3.1 | Nachweis des zellgebundenen Virus | 65 |
| 3.3.1.1 | Nachweis des Virusantigens mittels IIFT | 65 |
| 3.3.1.2 | Quantifizierung Zellassoziierter viraler Antigene mittels FACS | 67 |
| 3.3.1.3 | Analyse der viralen Proteine im Western blot | 69 |
| 3.3.2 | Lichtmikroskopie des CPE | 70 |
| 3.3.3 | Wachstumskinetik | 71 |
| 3.3.4 | Fazit 3 | 74 |
| 3.4 | Vermehrung der hv-IBDV-Stämme in den untersuchten Zellkulturarten | 74 |
| 3.4.1 | Beschreibung des Versuchs | 74 |
| 3.4.2 | Nachweis von hv-IBDV nach der ersten Passage | 75 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.4.2.1 | Analyse der viralen Proteine im Western blot | 75 |
| 3.4.2.2 | Nachweis des Virusantigens mittels IIFT | 76 |
| 3.4.2.3 | Quantifizierung zellgebundener Viren mittels FACS | 78 |
| 3.4.2.4 | RT-PCR und REA | 80 |
| 3.4.3 | Nachweis von hv-IBDV nach der zweiten und dritten Passage | 81 |
| 3.4.4 | Fazit 4 | 82 |
| 3.5 | Schlussfolgerungen | 83 |
| 4 | Diskussion | 85 |
| 4.1 | Etablierung einer Zellkultur aus CAM-Epithelzellen | 85 |
| 4.2 | Virus-Vermehrung in den embryonierten Hühnereiern | 89 |
| 4.3 | Biologische Eigenschaften der Viren in den Zellkulturen | 92 |
| 4.4 | Vermehrung der hv-IBDV-Stämme in HEF-Kulturen, CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen | 94 |
| 5 | Zusammenfassung | 99 |
| 6 | Summary | 101 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 103 |
| | Anhang | 131 |

Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| 3' (5') | 3' (5')-Ende eines Nukleinsäurestranges |
| Abb. | Abbildung |
| Aqua bidest. | Doppelt destilliertes Wasser |
| AS | <u>A</u> minosäure |
| ATP | <u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat |
| AK | <u>A</u> ntikörper |
| AGP | <u>A</u> garosegel- <u>P</u> räzipitationstest |
| Ala oder A | Alanin |
| Asp oder D | Asparaginsäure |
| Asn | Asparagin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BF | <u>B</u> ursa <u>F</u> abricii |
| bp | <u>b</u> ase pair |
| ca. | circa |
| CAM | <u>C</u> horioallantois <u>m</u> embran |
| cDNA | <u>c</u> omplementary DNA |
| cm | Zentimeter |
| CK | <u>C</u> ytokeratin |
| CPE | <u>c</u> ytopathogenic <u>e</u> ffect |
| DAB | 3-3' <u>D</u> iaminobenzidin |
| DMEM | <u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle <u>m</u> edium |
| DXV | Drosophila X-Virus |
| DNA | <u>D</u> esoxyribonucleic <u>a</u> cid |
| dNTP | <u>D</u> esoxyribonukleosid <u>t</u> riphosphat |
| ds | <u>d</u> oppel <u>s</u> trängig |
| EID ₅₀ | 50% <u>E</u> infektiösen <u>D</u> osen |
| EDTA | <u>E</u> thylendiamintetraacetat |
| EGF | <u>E</u> pidermal growth factor |
| ELISA | <u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked- <u>i</u> mmun <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay |
| FACS | <u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orter |
| FITC | <u>f</u> luorescein-5- <u>i</u> sothi <u>c</u> yanate |
| FKS | <u>F</u> etales <u>K</u> älberserum |
| g | Gramm |
| GKN | Glukosehaltige Kochsalzlösung |
| Gly oder G | Glycin |
| Gln oder Q | Glutamin |
| Glu oder E | Glutaminsäure |
| h | <u>H</u> our(s) |
| HEF | <u>H</u> ühnerembryo <u>f</u> ibroblasten |

| | |
|------------|--|
| HEL | <u>H</u> üner <u>e</u> mbryo <u>l</u> eberzellen |
| His oder H | Histidin |
| hv | <u>h</u> och <u>v</u> irulent |
| IHC | <u>I</u> mmun <u>h</u> isto <u>c</u> hemie |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| IBD | <u>i</u> nfectious <u>b</u> ursal <u>d</u> isease |
| IBDV | <u>i</u> nfectious <u>b</u> ursal <u>d</u> isease <u>v</u> irus |
| IIFT | <u>I</u> ndirekter <u>I</u> mmuno <u>f</u> luoreszenz <u>t</u> est |
| IPNV | infectious pancreatic necrosis virus |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid |
| IT | <u>I</u> nkubation <u>s</u> tag |
| ITS | <u>I</u> nsulin- <u>T</u> ransferrin- <u>S</u> elenium |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| λ | Wellenlänge |
| M | molar |
| m | milli |
| MOI | <u>m</u> ultiplicity <u>o</u> f <u>i</u> nfection |
| mA | Milliampere |
| mAk | <u>m</u> onoklonale(r) <u>A</u> ntik <u>ö</u> rper |
| mc | molecularly cloned |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| mm | Millimeter |
| Mitarb. | Mitarbeiter |
| μ | mikro |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| μ M | mikromolar |
| N | normal |
| n | nano |
| NCR | <u>n</u> on- <u>c</u> oding <u>r</u> egion |
| nm | Nanometer |
| nt | Nukleotid |
| OIE | <u>O</u> ffice <u>I</u> nternational des <u>É</u> pizooties |
| ORF | <u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> rame |
| OV | Oyster Virus |
| PAGE | <u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> el- <u>E</u> lektrophorese |
| PBE | <u>P</u> laque <u>b</u> ildende <u>E</u> inheit |
| PBS | phosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline |

| | |
|--------------------|--|
| PBS-T | PBS-Tween |
| PDT | <u>P</u> opulation <u>d</u> oubling <u>t</u> ime |
| PCR | <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction |
| p.i. | <u>p</u> ost <u>i</u> nfectionem |
| p. inoc. | <u>p</u> ost <u>i</u> noculationem |
| Pro | Prolin |
| REA | <u>R</u> estriktions <u>e</u> nzyman <u>a</u> lyse |
| RNA | <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid |
| RNase | Ribonuklease |
| RT-PCR | Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion |
| s. | siehe |
| S. | Seite |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| sec | Sekunde |
| Ser oder S | Serin |
| SPF | <u>s</u> pezifiziert <u>p</u> athogen <u>f</u> rei |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBS | Tris-gepufferte Kochsalzlösung |
| TEMED | NNN'N'-Tetramethylethylendiamin |
| TCID ₅₀ | 50% tissue culture infective dosis |
| Tris | Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan |
| TRITC | Tetramethylrhodamin-Isothiozyanat |
| TV | Tellina tenuis-Virus |
| Thr oder T | Threonin |
| U | Unit |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| ü.N. | <u>ü</u> ber <u>N</u> acht |
| v | virulent |
| V | Volt |
| VAP | Virale Anheftungsproteine |
| Vim. | Vimentin |
| Vol. | Volumen |
| VP | Virusprotein |
| VNT | Virusneutralisationstest |
| vv | <u>v</u> ery <u>v</u> irulent |
| wt | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |

1 Einleitung / Literaturübersicht

Die Gumboro-Krankheit zählt aufgrund ökonomischer Verluste zu einer der bedeutendsten Geflügelerkrankungen weltweit (Van den Berg 2000). Die ökonomischen Verluste sind vielschichtig und daher nur schwer zu quantifizieren. Sie setzen sich aus ansteigenden Mortalitätsraten und den Folgen einer klinisch unauffälligen Immunsuppression zusammen (Balamurugan u. Kataria 2006). Diese ist von Sekundärinfektionen sowie allgemein verminderter biologischer Leistungsfähigkeit erkrankter Tiere begleitet. Die Erkrankung hat sich in den letzten Jahrzehnten auf dem europäischen Raum, dem afrikanischen Kontinent, dem nahen Osten sowie Asien und Australien ausgebreitet (Faragher 1972; Firth 1974; Lin et al. 1993; Van den Sluis 1999; Chai et al. 2001; Hassan et al. 2002; Abdel-Alim et al. 2003; Remorini et al. 2006; Wang et al. 2007). Heute wird die IBD als internationales Problem verstanden: 95% der Mitgliedsstaaten des internationalen Tierseuchenamtes (Office International des Épizooties; OIE) berichten von klinischen Erkrankungen (Eterradossi 1995).

1.1 Das Virus der Infektiösen Bursitis

1.1.1 Geschichtlicher Überblick und Taxonomie

Die Gumboro Krankheit wurde 1962 in Gumboro, Delaware, USA erstmalig beschrieben (COSGROVE 1962). Bis 1964 waren fast alle Regionen Nordamerikas betroffen. Da das am stärksten betroffene Organ die Bursa Fabricii (BF) ist, wurde für die Krankheit die Bezeichnung Infectious Bursal Disease (IBD) eingeführt (WINTERFIELD u. HITCHNER 1962), das verursachende Virus als Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) bezeichnet.

Die taxonomische Einteilung des Virus in eine der bekannten Virusfamilien war umstritten. Es wurde den Picornaviren (CHO u. EDGAR 1969), den Adenoviren (ALMEIDA u. MORRIS 1973) sowie den Reo- und Rotaviren zugeordnet (KÖSTERS et al. 1972; HIRAI u. SHIMAKURA 1974; HARKNESS et al. 1975). Erst nach Isolierung des Erregers aus der BF erkrankter Hühner konnte das Virus nach Kultivierung in Hühnerembryofibroblasten (HEF) näher charakterisiert werden (NICK et al. 1976; MÜLLER et al. 1979a). Nach vergleichenden Studien der Strukturmerkmale von IBDV mit denen des Virus der infektiösen Pankreasnekrose (IPNV) der Salmoniden, dem Oyster Virus (OV) und dem Tellina tenuis Virus (TV) der Mollusken sowie dem Drosophila X Virus (DXV) durch DOBOS und Mitarb. (1979) wurden

diese Viren in einer neuen Familie, den "*Birnaviridae*" (bi - doppelt, RNA - Ribonukleinsäure), zusammengefasst (BROWN 1986).

1.1.2 Evolution des Erregers, Einteilung in Sero- und Pathotypen

Es werden zwei IBDV-Serotypen unterschieden: Serotyp 1 und 2, wobei der Serotyp 1 die klinische Erkrankung bei Hühnern verursacht (v-IBDV). Der Serotyp 2 gilt als apathogen. Kreuzimmunität bei mit Serotyp 2-infizierten Tieren zur Serotyp 1-Infektion besteht nicht (JACKWOOD et al. 1985). Als v-IBDV Stämme gelten alle älteren Stämme, die seit 1962 (COSGROVE 1962) isoliert worden sind. Auf sie treffen die in den Abschnitten 1.1.5 und 1.1.6 aufgeführten Bemerkungen über die Pathogenese sowie die Klinik einer IBDV-Infektion zu.

Seit 1984 sind in der Evolution von IBDV zwei Veränderungen beobachtet worden. Die erste war die Entwicklung von später als „variant strains“ bezeichneten Stämmen (ROSENBERGER u. CLOUD 1986) in den USA. Diese verursachten nicht die bisher bekannten klinischen Symptome. Es stand vielmehr eine ausgeprägte Immunsuppression erkrankter Tiere im Vordergrund. Die Variantstämme sind hoch zytolytisch und verursachen eine schnelle Bursaatrophie (innerhalb von 72 h p.i.) mit geringen Entzündungserscheinungen. Spezifiziert pathogenfreie (SPF) Küken der Rasse Leghorn im Alter von 3-4 Wochen zeigten IBD-Symptome (ROSENBERGER et al. 1985; 1987). Diese wurden auch bei Tieren beobachtet, die einen als protektiv geltenden Antikörpertiter gegen Serotyp 1-Infektionen besaßen. Es konnte mit Hilfe monoklonaler Antikörper gezeigt werden, dass ein Antigendrift für die Entstehung der „variant strains“ verantwortlich war (SNYDER et al. 1988). Die bisher durchgeführten Impfungen konnten nicht vor einer Infektion mit einem „variant strain“ schützen (GIAMBRONE u. GLOSSER 1990). Das Auftreten der so genannten Variantstämme blieb zunächst auf die USA und Mittelamerika beschränkt (SNYDER 1990; JACKWOOD u. SOMMER 1999). Vor kurzem wurde von Ausbrüchen in Australien berichtet (SAPATS u. IGNJATOVIC 2000; CHAI et al. 2001).

Das zweite bedeutende Ereignis in der Evolution von IBDV war die Entstehung von hoch virulentem Virus (hv-IBDV) im europäischen Raum seit 1987. Erste Berichte über das Auftreten von diesem besonders pathogenen Phänotyp stammten aus Belgien (VAN DEN BERG et al. 1991). Auch aus weiteren europäischen Staaten sowie aus dem afrikanischen, asiatischen und südamerikanischen Raum wurde über das Auftreten von hv-IBDV berichtet (FARAGHER 1972; FIRTH 1974; LIN et al. 1993; VAN DEN SLUIS 1999; CHAI et al. 2001; HASSAN et al. 2002; ABDEL-ALIM et al. 2003; REMORINI et al. 2006; WANG et al. 2007).

Die Infektion mit diesen hv-IBDV-Stämmen verursachte im Gegensatz zu den bis dahin auftretenden Stämmen des Serotyp 1 sowohl bei jungen als auch bei älteren Hühnern eine hohe Mortalitätsrate (bis 70% bei Legehennen, bis 25% bei Broilern). Im Unterschied zu den ab Mitte der achtziger Jahre in den USA isolierten Variantstämmen (SNYDER et al. 1992) konnten für die hv-IBDV-Isolate die gleichen Antigeneigenschaften wie bei den v-IBDV-Stämmen nachgewiesen werden (ÖPPLING 1991; ÖPPLING et al. 1991; SCHNITZLER et al. 1993). Weitere Charakteristika dieser neuen Stämme waren ihr Auftreten in vakzinierten Beständen, eine hohe Mortalität (> 60%) in SPF-Küken sowie ihre fehlende Vermehrbarkeit in Zellkultur.

Das klinische Bild war unspezifisch: gestörtes Allgemeinbefinden, wässriger Durchfall, Mattigkeit und plötzliche Todesfälle wurden beobachtet. Hohe Titer maternalen IBDV-Antikörper, gutes Hygienemanagement und gängige Impfungen konnten weder die Erkrankung verhindern noch den klinischen Verlauf mildern. Das aus Bursahomogenat isolierte Virus verursachte bei Infektionsversuchen an SPF Küken bis zu 100% Mortalität (VAN DEN BERG et al. 1991).

Die Entstehung von hv-IBDV ist nicht vollständig bekannt. Es besteht hinsichtlich der Antigenität enge Verwandtschaft mit den „classic strains“. Die verschiedenen Isolate scheinen genetisch sehr eng verwandt, so dass man von einem gemeinsamen Ursprung ausgeht (VAN DEN BERG et al. 1991; CHEN et al. 1998; HOQUE et al. 2002). Es wird vermutet, dass die hohe Virulenz der hv-IBDV-Stämme auf eine erhöhte Replikationsgeschwindigkeit zurückzuführen ist (ISLAM et al. 2001).

Isolate des Serotyps 2 wurden erstmals 1979 aus dem Respirationstrakt von Puten isoliert (McNULTY et al. 1979; JACKWOOD et al. 1982; CHETTLE et al. 1985). Der aus Puten isolierte Stamm 23/82 (CHETTLE et al. 1985) ist sowohl unter natürlichen als auch unter experimentellen Bedingungen für Hühner und Puten apathogen (JACKWOOD et al. 1982, 1985; ISMAIL et al., 1988). Sie verursachten keine auffälligen Veränderungen in der BF (MÜLLER 1987).

Das Virus vom Serotyp 2 weist dieselben generellen Strukturmerkmale des IBDV wie Serotyp 1 auf (JACKWOOD et al. 1984). Serotyp 2-Stämme besitzen im Vergleich zu Serotyp 1-Stämmen neben einer Vielzahl von Nukleinsäureaustauschen eine Insertion von drei Nukleotiden im Bereich des Virusproteins-2 (VP) (BERNSTEIN 1994). Zudem ist das apparente Molekulargewicht ihres VP2 gegenüber dem des Serotyps 1 geringfügig erhöht (BECHT et al. 1988). Replikation und Virulenz der Reassortanten (Segment A von Serotyp 1, Segment B von Serotyp 2) nehmen eine Mittelstellung zwischen den Elternviren ein (MÜLLER 1987) und werden daher offenbar von beiden Genomsegmenten bestimmt. Nach dem Austausch der nicht kodierenden Regionen (NCR) des Segments A innerhalb der beiden

Serotypen konnten keine Veränderungen der biologischen Eigenschaften *in vivo* festgestellt werden (SCHRÖDER et al. 2000).

NIEPER und MÜLLER (1996) zeigten, dass sich sowohl Viruspartikel des Serotyps 1 als auch des Serotyps 2 an lymphoide Zellen aus Bursa, Thymus und Milz binden. In Adsorptions- und Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Zelltypspezifität von IBDV nicht durch die Anwesenheit von spezifischen Strukturen determiniert wird (NIEPER 1995; NIEPER u. MÜLLER 1998). Damit ist klar, dass die Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der beiden Serotypen in der BF nicht auf der Ebene der Virusbindung liegen.

1.1.3 Virusstruktur

Das IBD-Virus besitzt ein unbehülltes, ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von 55-65 nm (HIRAI u. SHIMAKURA 1974; NICK et al. 1976; ÖZEL u. GELDERBLOM 1985). Das Genom besteht aus zwei Segmenten (A und B) einer doppelsträngigen RNA (BECHT 1980; DOBOS et al. 1979). Je nach Virusstamm ist Segment A ca. 3,4 kb, Segment B ca. 2,8 kb groß (MÜLLER et al. 1979a).

Segment A enthält zwei offene Leserahmen (*open reading frame*; ORF). Der größere kodiert für ein Vorläuferprotein VP0, aus dem nach Spaltung die Virusproteine VP2, VP4 und VP3 entstehen (AZAD et al. 1985; HUDSON et al. 1986; MÜLLER u. BECHT 1982), während der teilweise überlappende kleinere ORF für das Virusprotein VP5 kodiert (MUNDT et al. 1995). Segment B kodiert für VP1. VP2 und VP3 stellen die Hauptstrukturproteine dar und haben einen Anteil von 51% bzw. 40% am Gesamtvirusprotein (DOBOS et al. 1979).

VP4 ist eine virale Protease, die das Vorläuferprotein VP0 spaltet (JAGADISH et al. 1988; KIBENGE et al. 1997). Die Spaltstellen für die Strukturproteine liegen zwischen den Aminosäuren 511 - 514 und 754 - 756 (SANCHEZ u. RODRIGUES 1999). VP4 selbst ist in großen Mengen in den infizierten Zellen vorhanden (MÜLLER u. BECHT 1982). In diesen Zellen ist es im Zytoplasma und auch im Zellkern in Form von Mikrotubuli, jedoch nicht in den reifen Viruspartikeln zu finden (GRANZOW et al. 1997).

VP5 ist ein Nichtstrukturprotein, das für die Virusreplikation nicht essentiell (MUNDT et al. 1995, 1997), aber möglicherweise an der Freisetzung von IBD-Viren aus der Zelle beteiligt ist (LOMBARDO et al. 2000; YAO u. VAKHARIA 2001).

VP1 ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die in kleinen Mengen im Virion vorhanden ist. Für VP1 konnte RNA-Polymerase-, Guanylyltransferase- und Methyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden (SPIES et al. 1987; MÜLLER u. NITSCHKE 1987 b; SPIES u.

MÜLLER 1990; KIBENGE u. DHAMA 1997). VP1 spielt eine Rolle in der Transkription und Replikation des Virus (LOMBARDO et al. 1999).

Auf VP2 befindet sich die für die Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern wichtige so genannte „variable Region“. Neutralisierende Antikörper binden nicht an denaturiertes VP2, sondern nur an die native Form des Proteins, die B-Zell-Epitope auf VP2 sind also konformationsabhängig (BECHT et al. 1988). Die variable Region befindet sich im mittleren Drittel von VP2 im Bereich von Aminosäure 206-350 (BAYLISS et al. 1990). Zwei hydrophile Peaks an den Aminosäurepositionen 210-225 (*major peak A*) und 313-324 (*major peak B*) flankieren diese Region (HEINE et al. 1991). Es werden zwei weitere hydrophile Abschnitte innerhalb der variablen Region unterschieden, und zwar *minor peak 1* von Aminosäure 249-254 und *minor peak 2* von Aminosäure 279-290 (VAN DEN BERG et al. 1996).

Variantstämme und hv-IBDV-Stämme zeigen im Vergleich zu klassisch virulenten Stämmen Abweichungen in der Aminosäuresequenz in *major peak A* und *major peak B*. Bei hv-IBDV findet man im Vergleich mit klassisch virulenten Stämmen einen typischen Austausch im Bereich des *major peak A* an Aminosäureposition 222 (Pro → Ala) (BROWN et al. 1994; ETERRADOSSI et al. 1998). In Variantstämmen ist an dieser Position ebenfalls regelmäßig eine typische Abweichung von den klassisch virulenten Stämmen zu beobachten (Pro → Thr) (CHEN et al. 1998; DORMITORIO et al. 1997; ETERRADOSSI et al. 1998). Weitere Abweichungen, die bei Variantstämmen auftreten, befinden sich im Bereich des *major peak B*, an Position 318 (Gly → Asp) und an Position 321 (Ala → Glu). Diese Mutationen gehen einher mit dem Verlust der Bindungsfähigkeit von bestimmten monoklonalen Antikörpern an VP2, führen also zu Änderungen der Antigenität (ETERRADOSSI et al. 1998). Außerdem wird ein Aminosäureaustausch an Position 254 (Gly → Ser) als typisch für IBDV-Variantstämme angesehen (DORMITORIO et al. 1997).

Mutationen im Bereich der *minor peaks* führen zur Attenuierung des Virus. Mittels reverser Genetik wurden die Aminosäuren 253 (His → Gln) und 284 (Ala → Thr) ausgetauscht. Die rekombinanten Viren zeigten verringerte Pathogenität im Tier und verstärkte Replikation in der Zellkultur (MUNDT 1999; VAN LOON et al. 2002). Auch der Austausch von Aminosäure 279 (Asp → Asn) und 284 (Ala → Thr) führte zur Zellkulturadaptation (LIM et al. 1999).

Monoklonale Antikörper gegen VP3 erkennen Antigen von Serotyp 1 und Serotyp 2, sie detektieren somit gruppenspezifische Epitope (AZAD et al. 1987; BECHT et al. 1988).

1.1.4 Replikation von IBDV *in vitro*

Die Virusanzucht in der Zellkultur ist sehr zeitaufwändig, da ein zytopathischer Effekt erst nach mehreren Blindpassagen zu beobachten ist (LUKERT u. DAVIS 1974; JACKWOOD et al. 1987). Außerdem lassen sich die meisten Feldstämme nicht in Zellkultur vermehren, und damit ist eine Virusisolierung in einem Zellkultursystem nicht möglich (McFERRAN et al. 1980; VAN DEN BERG et al. 1991).

Beide Serotypen von IBDV lassen sich nach Adaptation *in vitro* in zahlreichen primären Zellkulturen, wie z.B. in embryonalen Hühnernierenzellen und HEF vermehren (LUKERT u. DAVIS 1974; NICK et al. 1976; McNULTY et al. 1979). Die Züchtung des Virus in HEF-Zellen war nur nach seriellen Passagen in embryonierten Eiern möglich (PETEK et al. 1973; HITCHNER 1970; YAMAGUCHI et al. 1996a; WANG et al. 2007). IBDV repliziert besser in Fibroblasten als in epitheloiden Zellen (NICK et al. 1976). Der dort erzeugte zytopathische Effekt ermöglicht die Titration der Infektiosität mittels Plaquetest (BECHT 1980). Neben Puten- und Wachtelembryofibroblasten (MÜLLER 1987) kann IBDV auch in permanenten Säugerzelllinien, wie RK-13, Vero, BGM-70 und MA-104 Zellen (PETEK et al. 1973; LUKERT et al. 1975; JACKWOOD et al. 1987; KIBENGE et al. 1988b) vermehrt werden. Die geeignetsten Zellen zur Anzucht sind B-Zelllinien vom Huhn (HIRAI u. CALNEK 1979). Hühnerembryofibroblasten und Leber- oder Nierenzelllinien können auch verwendet werden. CARDOSO und Mitarb. (2000) kultivierten den Lukert-Stamm in der Chicken Embryo Rough (CER) Zelllinie.

Nach *in vitro*-Infektion von Bursalymphozyten mit Cu-1 replizieren ca. 20% der Zellen das Virus (MÜLLER 1986a; MÜLLER 1987). Diese Diskrepanz in der Empfänglichkeit von Bursalymphozyten *in vivo* bzw. *in vitro* kann durch den Einfluss des Mikromilieus in der BF erklärt werden, da die Zugabe von BF-Extrakt von nicht-infizierten Hühnern replikationssteigernde Wirkung hat und die Virusausschüttung bei *in vitro*-Versuchen stark erhöht wird (MÜLLER 1986a; BURKHARDT u. MÜLLER 1987).

In Bursalymphozyten können nach *in vitro*-Infektion schon nach 90 min die ersten IBDV-spezifischen Proteine nachgewiesen werden. Nach 6 h ist die Infektiosität im Zellkulturüberstand nachweisbar (MÜLLER u. BECHT 1982). In HEF dauert die Eklipse nach Infektion mit Serotyp 1 vier bis sechs h (BECHT 1980; JACKWOOD et al. 1984), ein Replikationszyklus ist nach 10 - 16 h abgeschlossen (NICK et al. 1976; LUKERT u. DAVIS 1974); beim Serotyp 2 hingegen dauern Eklipse und Replikationszyklus etwas länger (JACKWOOD et al. 1984; MÜLLER 1987). In den permanenten Säugerzelllinien schließlich

beträgt die Latenzperiode 12-16 h und ein Replikationszyklus 48 h (LUKERT et al. 1975; JACKWOOD et al. 1987; KIBENGE et al. 1988b). Diese Daten unterstreichen nochmals, dass für IBDV in Bursalymphozyten die besten Replikationsbedingungen herrschen. Zum anderen geben sie einen Hinweis darauf, dass die Replikationsgeschwindigkeit von IBDV ein entscheidendes Kriterium für die Pathogenität und Virulenz der einzelnen Stämme darstellt.

Durch Passagen von IBDV mit höherer Infektionsmultiplizität (MOI) in HEF-Kulturen werden vermutlich regelmäßig durch dieselben Mutationen begünstigt. Es führt zu einer falschen proteolytischen Spaltung der vom Segment A kodierten Proteine und somit zur Entstehung falsch zusammengesetzter nicht-infektiöser Partikel. Diese defekten Partikel interferieren mit der Vermehrung der Standardpartikel, was mit steigender Anzahl der Passagen zu einem Absinken der Infektiosität führt (MÜLLER u. BECHT 1982; LANGE 1985; MÜLLER et al. 1986). Dieser Effekt wird als „von Magnus-Phänomen“ bezeichnet (VON MAGNUS 1954). Nach IBDV-Infektion von Bursalymphozyten treten derartige Partikel nicht in Erscheinung.

Das Putenisolat 23/82 zeigt sowohl bei *in vivo*-Infektionen als auch bei *in vitro*-Infektionen von Bursalymphozyten nur eine niedrige Infektionsrate von 1-2% der Zellen. Nur ein geringer Anteil (0,5-1%) der Lymphozyten aus dem Thymus bzw. der Milz ist zu einer Replikation von Serotyp 1 (HIRAI u. CALNEK 1979; CURSIEFEN 1980; MÜLLER 1986a; BURKHARDT und MÜLLER 1986; MÜLLER 1987) bzw. Serotyp 2 (MÜLLER 1987) fähig. *In vitro*-infizierte Zellen bilden jedoch annähernd gleich viele infektiöse Viruspartikel aus, gleichgültig, ob es sich bei dem Virus um Cu-1 oder 23/82 handelt und unabhängig davon, ob Lymphozyten aus Bursa, Milz oder Thymus infiziert worden sind (MÜLLER 1987).

Die Adaptation an Zellkultur ist nur mit wenigen hv-Isolaten gelungen und stets mit einer Attenuierung des Virus für das Huhn verbunden (YAMAGUCHI et al. 1996a, b; LIM et al. 1999; MUNDT 1999; ABDEL-ALIM u. SAIF 2001b; VAN LOON et al. 2002; RAUE et al. 2004; WANG et al. 2007). Weiterhin zeigten Sequenzanalysen der Genome von Wildtypviren und deren attenuierten Varianten, dass Mutationen in verschiedenen Regionen des Genoms für die Attenuierung von Stämmen verantwortlich sein können (MÜLLER et al. 1992; BERNSTEIN 1994; HASSAN et al. 1996; YAMAGUCHI et al. 1996b)

Es wird diskutiert, dass die Determinanten für Virulenz und Zelltropismus bei den zum Serotyp 1 gehörenden unterschiedlichen Phänotypen von IBDV im VP2 lokalisiert sind. In letzter Zeit konnten einige Aminosäureaustausche (Asp279Asn, Gln253His und Ala284Thr) in der variablen Region des VP2 identifiziert werden, die für die Adaptation der Stämme an die Zellkultur verantwortlich sind (LIM et al. 1999; MUNDT 1999; BRANDT et al. 2001; VAN LOON et al. 2002). Untersuchungen von BOOT und Mitarb. (2000) weisen darauf hin, dass VP2 zwar für die Replikation von hv-IBDV-Stämmen in Zellkultur verantwortlich ist,

nicht jedoch den alleinigen Faktor für das Auftreten unterschiedlicher Virulenzgrade innerhalb des Serotyp 1 darstellt. Bei hv-IBDV-Stämmen wird neben der variablen Region des VP2 besonders die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase als Virulenzdeterminante angesehen, da das VP1 dieser Stämme einen eigenständigen Ast im phylogenetischen Stammbaum von IBDV bildet und einige charakteristische Aminosäureaustausche aufweist (YAMAGUCHI et al. 1997; YEHUDA et al. 1999; ISLAM et al. 2001).

1.2 Infektiöse Bursitis

1.2.1 Epidemiologie

Der natürliche Wirt für das IBD-Virus sind Hühner. In Puten wurde das Virus ebenfalls nachgewiesen, allerdings zeigen Puten keine klinischen Symptome (CHETTLE et al. 1985). Antikörper gegen das Virus wurden u.a. auch in Krähen und wilden Fasanen gefunden (CAMPBELL 2001). Bei Hühnern sind alle Nutzungsrichtungen für eine Infektion empfänglich, wobei Tiere eines Legetyps stärkere Klinik zeigen und höhere Mortalitätsraten aufweisen (VAN DEN BERG et al. 1991). Die größte Empfänglichkeit für eine klinische Erkrankung ist bei Hühnern von der dritten bis zur sechsten Lebenswoche zu finden. Tritt eine Infektion früher auf, läuft die Erkrankung oft subklinisch ab und führt zu einer starken Immunsuppression (ALLAN et al. 1972; FARAGHER et al. 1974). Die Infektion kann oral, nasal, aerogen oder konjunktival erfolgen. Eine vertikale Übertragung wurde experimentell zwar nachgewiesen (LANDGRAF et al. 1980), in der Praxis liegen aber keine Hinweise dafür vor. Insekten wie der Getreideschimmelkäfer oder Mücken können als Vektoren fungieren (SNEDEKER et al. 1967; HOWIE u. THORSEN 1981). Das Virus der infektiösen Bursitis hat eine hohe Tenazität und kann über lange Zeit in Stallanlagen infektiös bleiben (BENTON et al. 1967). Zerstört wird das Virus durch Desinfektion mit 12,1%-igem Formalin, 0,5%-igem Chloramin und 1%-igem Kresol (FARAGHER 1972; IDE u. STEVENSON 1978).

1.2.2 Pathogenese

Die Infektion mit IBDV läuft nach dem Schema einer zyklischen Virusinfektion mit normiertem Verlauf ab (MÜLLER et al. 1979b; PALMQUIST et al. 2006). Nach oraler Aufnahme wird das Virus im Gastrointestinaltrakt von Makrophagen angenommen und gelangt über das Pfortadergefäßsystem in die Leber und von dort in die BF (MÜLLER et al. 1979b). Zielzellen des Virus sind die B-Zellen in der BF, die an den Folgen der Virusreplikation zugrunde

gehen (BURKHARDT u. MÜLLER 1987; VASCONCELOS u. LAM 1994; LAM 1997). Burssektomierte Küken überstanden die sonst meist tödlich verlaufende Infektion ohne wesentliche Krankheitsanzeichen, womit die Bedeutung der BF als Zielorgan des Virus wirkungsvoll demonstriert wurde (KÄUFER u. WEIS 1980). In T-Lymphozyten konnte keine Virusreplikation nachgewiesen werden (HIRAI u. CALNEK 1979; MÜLLER 1986 a,b).

Am empfänglichsten sind Tiere im Alter von 3-6 Wochen, bei denen sich die BF im Stadium maximaler Entwicklung befindet (BECHT 1980). Von dort kommt es nach massiver Virusreplikation zu einer zweiten Virämie und zu einer Überflutung des Organismus mit großen Virusmengen, so dass die Abwehrmechanismen des Wirtes überfordert werden, bevor sie wirksam werden. Eine solche Überflutung des Organismus ist die Voraussetzung für das Zustandekommen der Krankheitserscheinungen (CURSIEFEN et al. 1979; KÄUFER u. WEISS 1980). Ein Mangel der B-Lymphozyten hat auch eine reduzierte Immunantwort gegenüber anderen Infektionen zur Folge (KIM et al. 1999). Periphere Lymphozyten werden nur in geringem Maße infiziert, wodurch die hohen Antikörpertiter bei überlebenden Tieren erklärt werden, die nur von intakten B-Zellen produziert werden können (BECHT 1980).

Ebenso wurden Auswirkungen auf die zelluläre Immunantwort beobachtet (SHARMA u. FREDERICKSEN 1987; SHARMA et al. 1989; SHARMA et al. 2000). Es kommt zu Funktionsstörungen der T-Helferzellen sowie zur Aktivierung und Vermehrung von Suppressorzellen (SHARMA u. FREDERICKSEN 1987). Makrophagen produzieren in der akuten Phase der Infektion Stickstoffmonoxid (NO) sowie auf T-Zellen antiproliferativ wirkende Zytokine, wie z.B. Interferone (IFN), Interleukin (IL)-6 und IL-8 (KIM et al. 1998; SHARMA et al. 2000).

Eine entscheidende Rolle an der Beseitigung des Virus und der Regeneration der BF spielt die Einwanderung von T-Zellen in die BF (RAUTENSCHLEIN et al. 2002). Durch die Freisetzung von Zytokinen und durch zytotoxische Effekte verstärken diese Zellen jedoch auch die Schädigung des bursalen Gewebes und verzögern damit die Wiederbesiedlung des Organs mit B-Lymphozyten (RAUTENSCHLEIN et al. 2002).

Die Apoptose spielt in der Pathogenese der Erkrankung und in der von ihr ausgelösten Immunsuppression ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Vermehrung des Virus stellt eine essentielle Voraussetzung für die Induktion von Apoptose dar, da die Infektion von HEF-Kulturen mit inaktivierten, nicht mehr vermehrungsfähigen IBDV-Partikeln keine Apoptose auslöste (JUNGSMANN 2001; JUNGSMANN et al. 2001).

Es wurde nachgewiesen, dass die Pathogenität von IBDV vom Wirtssystem abhängig ist. Eine Passagierung im Vogel führt zur Steigerung der Pathogenität. Die Passagen im embryonierten Hühnerei konnten sowohl die Steigerung der Pathogenität als auch deren Abfall

verursachen (HITCHNER 1970; RODRIGUEZ-CHAVEZ et al. 2002). Die Zellkulturadaptation ist immer mit der Attenuierung des Virus verbunden (YAMAGUCHI et al. 1996 a, b; HASSAN u. SAIF 1996; LIM et al. 1999; MUNDT 1999; ABDEL-ALIM u. SAIF 2001b; VAN LOON et al. 2002; RAUE et al. 2004; WANG et al. 2007).

1.2.3 Klinik

Infektionen mit cv-IBDV verursachen eine Mortalitätsrate von 30% bei Erstaussbrüchen und bis 100% bei einer Infektion mit hv-IBDV (COSGROVE 1962; SNEDEKER et al. 1967; VAN DEN BERG et al. 1991). Erste Todesfälle werden mit Beginn der klinischen Erkrankung beobachtet, die meisten Ausfälle entstehen 5-7 Tage nach der Infektion. Die klinischen Symptome sind gekennzeichnet durch gestäubtes Gefieder, Appetitlosigkeit, Erschöpfung sowie wässrig-weißen Durchfall. Der Hauptbefund bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung am 3. Tag p.i. ist eine starke Hypertrophie der BF aufgrund einer Ödematisierung und Hyperämie (EDGAR u. CHO 1965; LUKERT u. SAIF 1997). Nach 5-8 Tagen p.i. geht die anfängliche Hypertrophie in eine Atrophie mit einem erniedrigten Bursa/Körpergewicht-Verhältnis über. Zum Teil sind hämorrhagische Entzündungserscheinungen zu beobachten. Bei schweren Erkrankungen treten zudem Störungen der Blutgerinnung auf, was zu Blutungen in der Brust- und Oberschenkelmuskulatur führt (SKEELES et al. 1980).

Am empfänglichsten sind die Tiere im Alter zwischen 3 und 6 Wochen. In den ersten Lebenstagen infizierte Hühner zeigen keine klinischen Erscheinungen (HITCHNER 1971). Die Infektionen verlaufen subklinisch und lösen Mikroläsionen in der BF (WINTERFIELD et al. 1972) sowie eine Immunsuppression (ALLAN et al. 1972) aus. Durch die Beeinträchtigung der humoralen Immunantwort (BECHT 1980; KIBENGE et al. 1988a; MÜLLER et al. 1992) infolge der Störung der Funktion der BF kommt es zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber sekundären Krankheitserregern, z.B. gegen über *Aspergillus flavus* (OKOYE et al. 1991), dem Avian Nephritis Virus (NARITA et al. 1991), dem Reovirus (MORADIAN et al. 1990), dem *Campylobakter jejuni* (SUBLER et al. 2006). Auch die Immunantwort nach Impfungen wird reduziert (FARAGHER et al. 1974). Der akute und der subklinische bzw. protrahierte Verlauf verursachen weltweit erhebliche wirtschaftliche Schäden in der Geflügelindustrie.

1.2.4 Diagnose

Bei einem akuten Ausbruch ermöglicht das klinische Bild in Zusammenhang mit der pathologisch-anatomischen Untersuchung eine Verdachtsdiagnose, die durch die histologische Untersuchung abgesichert werden kann. Bei Erkrankung sehr junger Hühner, bei Hühnern mit hohen maternalen Antikörperspiegeln und bei Infektion mit Variantstämmen stützt sich die vorläufige Diagnose nur auf die histopathologischen Befunde.

Eine sichere Diagnose ist am zuverlässigsten durch den direkten Virusnachweis aus der Bursa möglich. Andere Organe wie die Leber, der Thymus, die Nieren und die Milz eignen sich für den Nachweis nur bedingt, da das Virus dort nur in geringer Menge vorkommt (KÄUFER u. WEISS 1980; SCHAT et al. 1981; YAMADA et al. 1982; LEY et al. 1983; SHARMA 1986; XUE u. LIM 2001; KABELL et al. 2005). Zur IBDV-Anzucht wird das Organmaterial homogenisiert, abzentrifugiert und der Überstand auf die Chorioallantoismembran (CAM) von 9-11 Tage alten Hühnerembryonen verimpft (HITCHNER 1970). WINTERFIELD (1969) zeigte, dass die Virusmenge mit den Passagen in der Allantoishöhle steigt. Bei der Beimpfung der CAM ist eine höhere Menge des Virus in der CAM und im Embryo zu finden, als bei der Inokulation in die Allantoamnionhöhle. Es wurde auch ermittelt, dass das Virus seinen Wachstumsspeak nach 72 h p. inoc. erreicht (HITCHNER 1970). Ist die Probe IBDV-positiv, stirbt der Hühnerembryo nach drei bis fünf Tagen ab. Da die lymphoiden Zellen der B-Reihe die hauptsächlichen Zielzellen für die Vermehrung des IBDV sind (Käufer und Weis 1980), sind die Tierversuche in bestimmten Fällen für eine Virusisolation besser geeignet als eine Virusisolation im embryoniertem Ei (IDE 1975).

Das Virusantigen kann in histologischen Präparaten immunhistochemisch oder mit Hilfe der Immunfluoreszenz detektiert werden. Der Immunoblot kann auch verwendet werden (PEREIRA et al. 1998; RODRIGUEZ-CHAVEZ et al. 2002; LIMA et al. 2005).

In der serologischen Diagnostik werden der Virusneutralisationstest (VNT), der Agarosegel-Präzipitationstest (AGP) und kommerziell erhältliche ELISA-Systeme verwendet. Mit dem VNT können Antikörper gegen verschiedene Serotypen des Virus unterschieden werden (JACKWOOD u. SAIF 1987), während das ELISA-System ein schneller Test ist, der routinemäßig zum Monitoring des Antikörperstatus einer Herde verwendet wird. Mittels Antigen-Capture-ELISA lassen sich Feldstämmen differenzieren (ETERADOSSI et al. 1997; 1999). Die Ergebnisse im VNT und im ELISA korrelieren miteinander (SOLANO et al. 1986).

In Bezug auf die Impfung besteht das Hauptinteresse der Geflügelindustrie in einer Differenzierung zwischen hv-IBDV-Stämmen und cv-BDV-Stämmen. Außer einer molekularen Charakterisierung von IBDV-Stämmen können eine Reihe von mAK zur Unterscheidung innerhalb von Serotyp 1-Stämmen genutzt werden (Antigen-Capture-ELISA; ETERRADOSSI et al. 1997, 1999).

Als sensitivstes Diagnostikum ist die RT-PCR zu nennen, die Virus-RNA nachweist (KATARA et al. 2001; LEE et al. 1992; WU et al. 1992; THAM et al. 1995; KABELL et al. 2005). Dabei werden meist Sequenzen amplifiziert, die für VP2 oder VP3 kodieren. Mit der Restriktionsenzymanalyse (REA) der PCR-Produkte ist eine schnelle Unterscheidung zwischen den zwei Haupttypen von Feldisolaten, den klassisch virulenten und den hochvirulenten IBDV-Stämmen, möglich (JACKWOOD u. SOMMER 1999; ZIERENBERG et al. 2001; VAN DEN BERG et al. 2004). Mittlerweile gibt es auch Protokolle für den IBDV-Nachweis in Real-time quantitativer RT-PCR (JACKWOOD et al. 2003; PETERS et al. 2005).

Weiterhin kann die Elektronenmikroskopie zur Darstellung ganzer Viruspartikel verwendet werden.

1.2.5 Differentialdiagnose

Aufgrund der akuten Krankheitserscheinungen wie Depression und Durchfall ist Kokzidiose auszuschließen. Nephropathogene Stämme des Virus der infektiösen Bronchitis können ähnliche Nierenveränderungen verursachen, wie sie gelegentlich bei IBD gefunden werden. Weitere Erkrankungen wie die Newcastle-Krankheit oder septikämisch verlaufende bakterielle Infektionen müssen abgegrenzt werden. Die typischen Bursaveränderungen sind aber nur bei einer IBDV-Infektion zu finden. Blutungen in der Muskulatur und im Drüsenmagen werden auch bei dem Auftreten des hämorrhagischen Syndroms beobachtet, das durch einen Vitamin K-Mangel, wie er z. B. bei Verabreichung von Sulfonamiden auftreten kann, verursacht wird. Bei dem hämorrhagischen Syndrom sind die Blutungen als Hauptsymptom aber stärker ausgeprägt. Andere Organveränderungen fehlen.

1.3 Die Chorioallantoismembran (CAM)

1.3.1 Physiologische Bedeutung der CAM

Die CAM ist die extraembryonale Membran des Hühnerembryos (s. Abb. 1), die zwischen dem 8. Inkubationstag (IT) und dem 20. IT die Lungenfunktion des Embryos übernimmt (HAMBURGER u. HAMILTON 1951; TAZAWA 1978; DEFOUW 1988; RIZZO u. DEFOUW 1993; VAN GOLDE et al. 1996). Ihre respiratorische Funktion beruht auf der Ausbildung eines dichten kapillaren Netzwerkes (ROMANOFF 1960; TAZAWA 1978). Sie ist auch für den Kalziumtransport (ROMANOFF 1960; TEREPA u. STEWART 1969; DUNN 1981; AKINS u. TUAN 1993) von der Schale in den Embryo verantwortlich. Während der ersten 10 Tage erhält der Embryo sein Kalzium vom Dottersack, aber die benötigte Menge steigt in den letzten 11 Tagen der Inkubation stark an, da die Knochen zu ossifizieren beginnen. Das Kalzium wird dann hauptsächlich von der Schale bereit gestellt (Kontakt zur CAM), welche dadurch bis zu 50% ihres Gewichtes verliert. Weiterhin ist die CAM ein Sammelbecken für stickstoffhaltige Endabbauprodukte, welche durch den Embryo produziert werden.

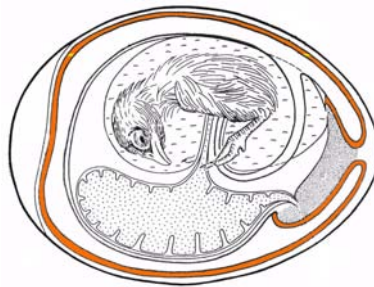


Abbildung 1: Chorioallantoismembran (markiert) in einem 10 Tage bebrüteten Hühnerei (nach RÜSSE u. SINOWATZ, 1991).

1.3.2 Entstehung der CAM

Das Chorion- und Allantoisepithel, ehemals ektodermalen und endodermalen Ursprungs, sind zusammen mit dem vaskularisierten Stroma mesodermalen Ursprungs an der Bildung der CAM beteiligt (RIBATTI et al. 1996). Die CAM bildet sich zwischen dem 4. und dem 5. IT durch die Fusion des Chorions und der Allantois aus (DEFOUW 1988; RIZZO et al. 1995). Das Chorionepithel ist zwei Zellschichten dick und nach außen gerichtet, das Allantoisepithel ist eine Einzelschicht und nach innen gerichtet (LEESON u. LEESON 1963; ROMANOFF 1960). Zu diesem Zeitpunkt verteilen sich undifferenzierte Blutgefäßinseln im Mesoderm der CAM. Diese zeigen bis zum 8. IT ein rasantes Wachstum mit der Ausbildung eines kapillaren Netzwerkes unterhalb der Basalmembran des ektodermalen Epithels, welche ab dem 14. IT auch in supraepithelialer Position zu liegen kommt (LEESON u. LEESON 1963; RIZZO et al. 1995). Die CAM ist damit das einzige bekannte vaskularisierte Epithel. Zwischen dem 10. und dem 12. IT erreicht die CAM ihre maximale Vaskularisierung (AUSPRUNK et al. 1975; FITZESCHWIND 1973) und die Epithelschicht ist voll differenziert (SETHI u. BROOKES 1971; COLEMAN u. TEREPAKA 1972; NARBRAITZ 1977). Die ersten abgestorbenen Zellen sind zu diesem Zeitpunkt im Chorionepithel zu finden (ROMANOFF 1960).

1.3.3 Blutfluss

Im intakten Ei breiten sich die CAM und ihre Gefäße über die Oberfläche des Dottersackes aus und bedecken ihn am 6. oder 7. Tag komplett (FUCHS u. LINDENBAUM 1988). Das reichliche Gefäßsystem, welches sich in der Mesodermis entwickelt, wird durch die paarigen Allantoisarterien und -venen versorgt. Die Nabelarterien bringen CO₂ und Stoffwechselprodukte in die Allantois (nach Verschmelzung zur CAM - in die CAM), und die Nabelvenen versorgen den Embryo mit sauerstoffreichem Blut. Die CAM wird von der linken und der rechten Chorioallantoisarterie versorgt, aber der venöse Abfluss des Blutes aus der CAM verläuft über die Chorioallantoisvene (DEFOUW 1988).

Die Arterien bringen das sauerstoffarme Blut in Kontakt mit der CAM, wo der Gasaustausch durch die Eierschale erfolgt. Die Vene transportiert das sauerstoffreiche Blut wieder zurück zum Embryo (s. Abb. 2). Diese Gefäße sind äquivalent zu den Nabelgefäßen der Säugetiere (VAN GOLDE et al. 1996).

Die Architektur der Mikrozirkulation in der CAM ist ähnlich der von reifem Lungengewebe (FUCHS u. LINDENBAUM 1988). Obwohl es Unterschiede zwischen den

(BORGES et al. 2003). Das ökonomische und praktische Wirtssystem für die Herstellung von Influenza-Vakzinen ist bis heute das embryoniertes Hühnerei.

Bei zahlreichen Fragestellungen in der Virologie schien es angezeigt, Viren nicht nur nach klassischer Methode im bebrüteten Hühnerei zu vermehren, sondern die Wirtszellen aus der Chorioallantoismembran des Hühnereies *in vitro* zu züchten. Besonders in der Influenza-Forschung wurden Versuche in dieser Richtung unternommen. So entwickelten FAZEKAS und Mitarb. (1958) die „allantois-on-shell“-Methode, wobei Membranstücke zusammen mit der Schalenhaut und der Kalkschale in synthetischem Medium inkubiert wurden. BERNKOPF (1949) benutzte deembryonierte Eier. BRAND (1958) und später SAMUEL und Mitarb. (1981a, b) zerschnitten die Membran in kleine Stücke, die nach einer Inkubationszeit von 5-6 Tagen in synthetischem Medium beimpft wurden.

Obwohl manche Fragestellungen mit diesen Methoden bearbeitet werden konnten, blieb deren Anwendung beschränkt, da sie mit zu großem Aufwand und zahlreichen Unsicherheiten verbunden war. Für die Bearbeitung der Zielstellung der Arbeit war es notwendig, die Zellen aus der CAM bebrüteter Hühnereier als Monolayer zu kultivieren. CURSIEFEN und BECHT (1975) war es gelungen, Myxoviren, Herpesviren, Aviäre Reoviren und das Virus der Infektiösen Bronchitis in solchen Kulturen zu züchten. SETO und Mitarb. (1981) untersuchten die Biosynthese des Glykoproteins von Paramyxoviren in der CAM-Zellkultur. ZIERENBERG (2001) zeigte, dass die *in ovo*-Transfektion des nicht-zellkulturadaptierten hv-IBDV möglich ist. In diesem Fall wurden die Transkription und anschließende Passagen der IBDV-Mutanten 849VBr und 849VBA-Cu-1B auf der CAM durchgeführt.

1.4 Epithelzellen *in vitro*

Epithelzellen bilden die erste Schutzbarriere gegen Bakterien, Viren, Parasiten sowie chemische oder verschiedene biologische Substanzen. Zellkulturen aus Epithelzellen sind für Infektionsversuche und zellbiologische Untersuchungen von großer Bedeutung.

GIRJES und Mitarb. (2003) berichten, dass sich in den Koala-Konjunktivalepithelzellen zwei Spezies von Chlamydien vermehren lassen, die in den Koalas nachgewiesen wurden. Die Zellkultur von Trachealepithelzellen, die von WIDDICOMBE (1988) und YAMAYA und Mitarb. (1992) beschrieben wurde, wird benutzt, um die Pathogenese der Rhinovirus-Infektion der Atemungswege (TERAJIMA et al. 1997; YAMAYA et al. 1999; SUZUKI et al. 2000) zu erforschen.

Bei dem Rotavirus ist ein Tropismus zu den differenzierten Enterozyten des Intestinalepitheliums festgestellt. BRUNET und Mitarb. (2000) referieren, dass die Intestinalepithelzellen sich *in vitro* mit dem Rotavirus infizieren lassen.

Auch wurden der Transport von Arzneimitteln und der Ionen-Austausch mit Hilfe von Zellkulturen aus den Epithelzellen des Respirationstrakts analysiert (LANDMANN 1988; MATHIAS et al. 1995; YAMASCHITA et al. 1998; SHEN et al. 1999).

GUIDRY und Mitarb. (1998) präsentieren die Endothelial/Epithelial-Zellkultur aus dem Euter der Rinder als Modell der Blut-Milch-Schranke.

Die *in vitro* Vermehrung der Humanepidermalkeratinozyten ist gut untersucht (BOYSE u. HAM 1983; VAN MUIJEN et al. 1987; PILLAI et al. 1990, ZAMANSKY et al. 1992). Die Zellkulturen von den Keratinozyten deuten auf die zellulären und molekularen Mechanismen der Hautentstehung, Entwicklung und Pathologie (RHEINWALD u. GREEN 1975; RHEINWALD 1980; DLUGOSZ 1995; LEVY et al. 1998).

1.4.1 Züchtung der Epithelzellen (allgemeine Grundlagen)

Die Schwierigkeiten, die bei der Züchtung von Epithelzellen *in vitro* oft beschrieben werden, sind für alle Arten der Epithelzellen identisch. Zu den allgemeinen Schwerpunkten sind folgende zu zählen:

- nur kleine Mengen sind isolierbar,
- die meisten kommerziellen Medien werden für die Isolierung von Fibroblasten verwendet,
- die Epithelzellen haben schwache Adhäsionsfähigkeiten,
- Fibroblasten können das Wachstum von Epithelzellen unterdrücken,
- die Epithelzellen sind schwer passagierbar.

Die allgemeinen Prinzipien der Isolierung der Epithelzellen sind von mehreren Autoren beschrieben. Eine erfolgreiche Isolierung der primären Zellen besonders epithelialer Herkunft ist mit der Kollagenasebehandlung verbunden. Die Kollagenase löst die extrazellulären Substanzen und erleichtert den Übergang der Zellen in die Suspension (WAYMOUTH 1974). Die Behandlung nur mit Kollagenase konnte nicht zur Entstehung einer Zellsuspension führen, deswegen mussten die Gewebe weiter mit Trypsin oder Pronase behandelt werden (WAYMOUTH 1974). Bei der Isolierung der Epithelzellen ist es erforderlich, eine schonende Bearbeitung des Materials durchzuführen d.h., die ausgewählten Enzym-Konzentrationen sollen so gering wie möglich sein (BASHOR 1979; ITAMI et al. 1999; RADU u. ACKERMANN 2004). Die Zugabe von EDTA hat auch eine positive Wirkung (JAMES et al. 1979; FUJIE et al.

1996). Da die Epithelzellen sehr empfindlich sind, ist es empfehlenswert, eine kurze enzymatische Behandlung vorzunehmen.

Die entstehende Zellsuspension enthält die verschiedenen Zelltypen, und nur wenige sind vermehrungsfähig bzw. undifferenziert. Um die Proliferation der Epithelzellen zu fördern, benutzt man Medium mit einem niedrigeren Ca^{2+} -Gehalt (BOYCE u. HAM 1983; ODA et al. 1990; WICHE et al. 2003; SEO et al. 2004).

BREITKREUTZ et al. (1984), MATSUYAMA et al. (1997), MARUOKA et al. (1997) benutzten in ihren Untersuchungen Medium mit einem Ca^{2+} -Gehalt von 0,1 mM. Andere Untersuchungen zeigten, dass der Ca^{2+} -Gehalt auch 0,15 mM (ODA et al. 1990; ZAMANSKY et al. 1992; ANG et al. 2004) oder auch weniger (BERTOLERO et al. 1984; VAN MUIJEN et al. 1987; YUSPA et al. 1989; SEO et al. 2004) betragen kann. Die meisten der kommerziellen Medien sind für die Vermehrung der primären Fibroblasten oder Zelllinien bestimmt und enthalten 2,4 mM Ca^{2+} (MORGAN 1955; DULBECCO u. FREEMAN 1959).

Auch fördert das FKS die Differenzierung der Zellen und stoppt deren Vermehrung (BERTOLERO et al. 1986; SANTOS et al. 2003). Da die Gefahr des Fibroblastenüberwuchses durch einen höheren FKS-Gehalt gleichzeitig steigt, wird bei der Züchtung der Epithelzellen entweder ein serumfreies oder ein zelltypspezifisches Medium benutzt (BERTOLERO et al. 1984, 1986; ODA et al. 1990; PILLAI et al. 1990; ANG et al. 2004).

Ein geeignetes Medium, das einen niedrigeren Ca^{2+} -Gehalt hat und gleichzeitig für die Kultivierung der Zellen unter serumfreien Bedingungen geeignet ist, ist die „Ham’s Nutrient Mixture“ Ham’s F12 (BOTTENSTEIN 1979; HU et al. 1992; SONG et al. 2004). Dieses Medium wurde für die Züchtung primärer Epithelzellen entwickelt (HAM 1965). Um den Verlust der Serum-Wachstumsfaktoren zu kompensieren, werden serumfreie Medien mit synthetischen Zusätzen angereichert. Die folgende „klassische“ Zusammensetzung für ein serumfreies Medium ist in mehreren Veröffentlichungen erwähnt:

- Rinder-Insulin 5 µg/ml
- menschliches Transferrin 5 µg/ml
- Putrescin (Tetramethyldiamin) dihydrochlorid 100 µg/ml
- Progesteron 20 nM
- Na-Selenit (Na_2SeO_3) 30 nM
- Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF)

Das serumfreie hormonsupplementierte Medium wird benutzt, um die Epithelzellen von der gemischten Population zu selektieren und ihr Wachstum zu fördern (GUIDRY et al. 1998; FUJIE et al. 1996; RÖPKE 1997). Die Autoren zeigten, dass die Epithelzellen sehr langsam wachsen. Die „population doubling time“ (PDT) kann 15 h bis 40 h betragen (BOYSE u. HAM

1983; OKABE 1984; SADOVNIKOVA 1990). Ein Vergleich der Vermehrung der Epithelzellen mit und ohne FKS-Zugabe zeigt, dass die PDT in beiden Systemen vergleichbar hoch ist. Die PDT beträgt 20 h bei einer Mischung von DMEM und Ham's F12 Medium im Verhältnis 3:1 mit 10% FKS und 28 h, wenn das serumfreie, hormonsupplementierte Medium benutzt wurde (BOTTENSTEIN 1979).

Es gibt Berichte, dass die Epithelzellen eine nur sehr kurze Lebensdauer (bis zu 10 Tage bzw. 5-6 Zellgenerationen) haben (YAMAYA et al. 1992; KARAM u. LEOBLOND 1993), deswegen geht es bei der Züchtung der Epithelzellen *in vitro* um die „short-term Kultur“. Diese Zellen müssen daher immer frisch gewonnen werden und lassen sich nicht passagieren. Andere Autoren dagegen gelingt es die Zellen mehrere Tage wachsen zu lassen (GREEF u. HUMBEL 1989; SADOVNIKOVA 1990; FUJIE et al. 1996; RADI u. ACKERMANN 2004; SONG et al. 2004). In dem Fall geht es um ca. 50 Zellgenerationen und mehrere Zellpassagen.

1.4.2 Phänotyp-Bestimmung

Das Zytoskelett besteht aus vier zytoplasmatischen Filamenten, den Mikrofilamenten, den Myosin-Filamenten, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten. Unter diesen Zytoskelett-Filamenten sind die Intermediärfilamente als Differenzierungsmarker weitaus am bedeutendsten (MOLL et al. 1982).

Die Zytokeratinfilamente sind epithelspezifische Strukturen des Zytoskeletts. Abhängig von ihrem isoelektrischen Punkt und ihrem Molekulargewicht werden die Zytokeratine in zwei Subfamilien eingeteilt (MOLL et al. 1982). Die saure Subfamilie (Typ I) enthält die Zytokeratine 9 bis 20 mit Molekulargewichten von 40 - 64 kDa, die neutral/basische Subfamilie (Typ II) beinhaltet die Zytokeratine 1 bis 8 mit Molekulargewichten von 52 - 68 kDa. Sie kommen in Epithelien, sowie in Derivaten der Haut (z.B. Haare, Nägel) vor. Die Zytokeratinfilamente bestehen aus einem Typ-I- und einem Typ-II-Zytokeratin. Das bedeutet, die Typ-I- und Typ-II-Zytokeratine werden paarweise exprimiert, indem sich ein saures Keratin an einen basischen Partner bindet. Ein Tetramer aus jeweils zwei sauren und zwei basischen Keratinen stellt die eigentliche Grundeinheit des Zytokeratinfilaments dar (MOLL et al. 1982).

Da eine Epithelzelle mindestens ein Zytokeratinpaar enthält, kann durch Untersuchung der Zytokeratinexpression eine epitheliale Differenzierung nachgewiesen oder ausgeschlossen werden (GROWN u. VOGEL 1985; RADI u. ACKERMANN 2004; SONG et al. 2004; SEO et al. 2004; UPASANI et al. 2004).

Auch Vimentin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und zählt zu den Intermediärfilamenten der Klasse III. Es ist ein schwer lösliches, einheitliches Protein, welchem

eine strukturerhaltende Rolle zukommt. Vimentin ist ein einzelnes Protein mit einem Molekulargewicht von 58 kDa (FRANKE 1982). Mesenchymale Zellen wie Fibroblasten, Fibrozyten, Endothelzellen, Hämatopoetische Zellen, Zellen melanozytärer und lymphatischer Herkunft etc. exprimieren konstant Vimentin (DU BOULAY 1985; BANERJEE u. HARRIS 2000).

1.5 Ziele der Arbeit

Das IBDV als Erreger der weltweit auftretenden infektiösen Bursitis verursacht hohe wirtschaftliche Verluste in der Geflügelhaltung. Wegen der hohen Tenazität des Erregers (BENTON et al. 1967; CHO u. EDGAR 1969; PETEK et al. 1973; KÄUFER u. WEISS 1980; MÜLLER 1986b) und einem möglichen Überleben des Erregers in Geflügelbeständen auch nach Reinigung und Desinfektion sowie wirtschaftlicher Zwänge ist eine Kontrolle der infektiösen Bursitis nur durch Vakzination möglich (KIBENGE et al. 1988a).

Die Entstehung von hv-IBDV stellt eine neue Problematik in der Geflügelhaltung und in der IBD-Forschung dar. Da die hv-IBDV-Stämme in vakzinierten Beständen auftreten und eine hohe Mortalität verursachen, ist der Schutz der Tiere vor diesen neuen Viren von großer Bedeutung.

Die hv-Stämme können bislang nicht *in vitro* vermehrt werden. In dieser Arbeit sollte daher versucht werden, ein neues Zellkultursystem zu finden, das den biologischen Eigenschaften des hv-IBDV entspricht und dessen Vermehrung ermöglicht. Unter Berücksichtigung der biologischen Grundlagen der Virusreplikation ist auch von Interesse, das Virus so zu züchten, dass Veränderungen auf der Genomebene vermieden werden und die Virulenz erhalten bleibt.

Bei der Virusanzüchtung *in ovo* wird das Virus auf das Chorionepithel gegeben. Im Vergleich zu der Infizierung der Allantoishöhle ist die CAM sensibler und ermöglicht, eine größere Menge des Virus zu erzeugen (HITCHNER 1970). Daher sollte eine primäre Zellkultur aus den CAM-Epithelzellen etabliert und deren biologischen Eigenschaften hinsichtlich der Unterstützung der Virusvermehrung untersucht werden.

Da in der Leber die Virusvermehrung sowohl *in vivo* als auch *in ovo* stattfindet (KÄUFER u. WEISS 1980; ETERADOSSI et al. 1999), war es interessant, die primären Hepatozyten auf eine Unterstützung der Virusreplikation hin mitzuprüfen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit der Anzüchtung des hv-IBDV auf den CAM-Epithelzellen und den Hepatozyten geprüft.

Der Stamm BD-3/99tc wurde mittels reverser Genetik hergestellt und ist für Hühner apathogen. Dieser Stamm wird als möglicher Vakzine-Stamm betrachtet. Da keine Untersuchungen seiner biologischen Eigenschaften in der Zellkultur vorliegen, wurde als weitere Aufgabe dieser Arbeit gesehen, die Biologie des BD-3/99tc-Stammes in der Zellkultur zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Blotting-Kammern: für Western Blot (von Keutz, Reiskirchen); Brutschränke: (Memmert, Schwabach; Heraeus, Hanau); Eiinkubator: (Schumacher, Grünberg-Ladenbach); Elektrophoresekammern: Vertikal-Gel-Elektrophorese (BioRad, München); Gel-Dokumentationssystem: Multi-Image™ Light Cabinet (Biozym, Oldendorf); Heizblöcke: (Eppendorf, Hamburg); Kühl- und Gefrierschränke: (Liebherr, Ochsenhausen); Magnetrührer: (Ikamag Reo); Mikroskope: Umkehr-Mikroskope (Olympus, München), Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus, München); Photometer: DU-640 (Beckman, München); Pipettierhilfen: (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich; Integra Biosciences, Fernwald; Hirschmann, Eberstadt); Schüttler: Vortexer (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz), Orbitalschüttler (Forma Scientific); Sequenza-System: (Shandon, Frankfurt/Main); Sterilwerkbänke: (Heraeus, Hanau); Thermocycler: TouchDown™ (Hybaid, Heidelberg); Ultraschallgerät: Sonifier 250 (Branson); Wasserbäder: GFL (Burgwedel); Zentrifugen: Tischzentrifuge, gekühlt (Heraeus, Hanau), Zellkulturzentrifuge (Heraeus, Hanau), Ultrazentrifuge (Beckman, München), Großzentrifuge „Avanti“ (Beckman, München).

2.1.2 Verbrauchsmaterial

3MM-Papier: (Schleicher & Schüll, Daßel); Deckgläschen: (Roth, Karlsruhe); Gewebekulturschalen: (Greiner, Frickenhausen); Magnetstäbchen Sortiment: (Roth, Karlsruhe); Nitrozellulosemembran: (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA); Pipettenspitzen: (Greiner, Frickenhausen); Reaktionsgefäße: 50 ml, 15 ml, 1,5 ml (Greiner, Frickenhausen), 0,2 ml für PCR (Biozym, Oldendorf); Sterilfilter: 0,2µ (Sartorius, Göttingen); Zellschaber: (Costar, Cambridge, MA, USA).

2.1.3 Embryonierte Hühnereier

Zur Herstellung von Kulturen aus HEF und CAM-Epithelzellen wurden befruchtete Hühnereier von der Firma Kürbis (Würzweg, Sachsen) bezogen und 10 Tage im Schrankbrüter (Schumacher, Grünberg-Ladenbach) bei einer Temperatur von 38°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% bebrütet.

Für die Anzüchtung von hv-IBDV-Isolaten und die Ermittlung der EID₅₀ wurden die Eier nach dem 11. Bebrütungstag bearbeitet.

2.1.4 Viren

Der als „hochvirulent“ charakterisierte Stamm BD-3/99wt von Feldausbrüchen in Bangladesch im Jahr 1999 (ISLAM et al. 2001) und sein molekularklonierter Parentalstamm BD-3/99mc wurden von Prof. Dr. M. R. Islam (Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science of Bangladesh Agricultural University, Bangladesh) zur Verfügung gestellt. Der Stamm BD-3/99wt wurde als Embryohomogenat (1. und 2. Eipassage), der Stamm BD-3/99mc als 20%-iger Bursasuspension im Institut für Virologie an der Universität Leipzig bei -80°C gelagert.

Der in den Versuchen verwendete Stamm Cu-1 gehört zum Serotyp 1 vom IBDV und ist eine Variante eines von NICK et al. (1976) in Gießen isolierten pathogenen Wildtyps. Dieser Stamm ist virulent und an HEF adaptiert (LANGE et al. 1987)

Die Adaptation vom BD-3/99wt zur Replikation in der HEF-Zellkultur erfolgte mittels reverser Genetik. Die Aminosäuren wurden in VP2 an den Positionen Q253H-A284T ausgetauscht. Der entstehende zellkulturadaptierte Stamm BD-3/99tc ist attenuiert für Küken (RAUE et al. 2004). Das Virus stammt aus den Vorräten des Instituts.

2.1.5 Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden, neben anderen, Enzyme folgender Lieferanten verwendet: Kollagenase: Roth, Karlsruhe; Hyaluronidase: Roth, Karlsruhe; Trypsin: Life Technologies, Karlsruhe; Streptavidin-Peroxidase: Boehringer, Mannheim; Restriktionsendonukleasen: AGS, Heidelberg; New England Biolabs.

2.1.6 Molekulargewichtsmarker

2.1.6.1 DNA-Längenstandard λ dV1/PAT

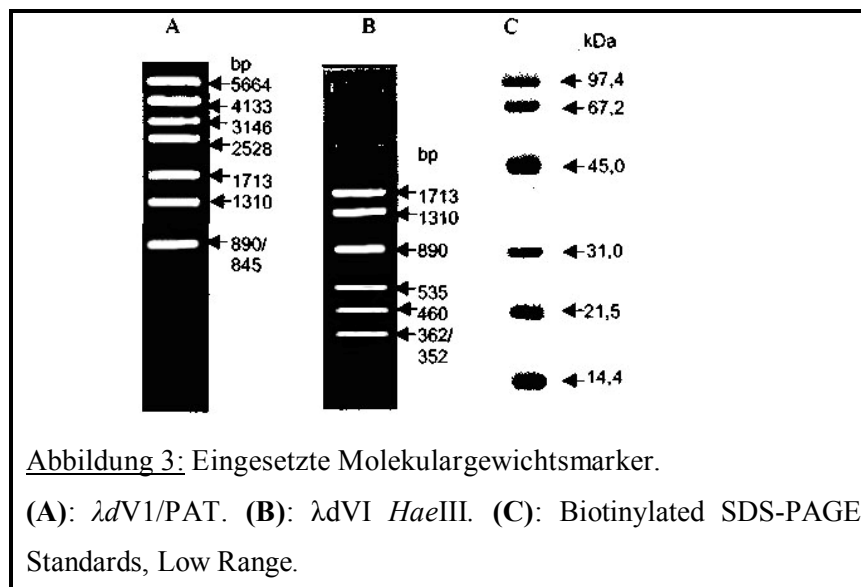
Als DNA-Längenstandard wurde eine Mischung aus *Pst*I-, *Bam*HI-, *Hind*III-Fragmenten des Plasmids *PAT553/PB1* (Prof. Dr. Dr. G. Hobom, Gießen) und *Hae*III-verdauter Phagen-DNA von λ dV1 (Prof. Dr. Dr. G. Hobom, Gießen) verwendet. Es entstehen Fragmente mit folgenden Längen (in bp): 5664, 4133, 3146, 2528, 1713, 1310, 890, 845, 696, 535, 460, 362, 352, 272, 223, 213, 212, 178, 142, 132, 83, 40 (Abb. 3 A).

2.1.6.2 DNA-Längenstandard λ HaeIII

Als Längenstandard für kleinere DNA-Fragmente wurde DNA vom Phagen λ dV1 (Prof. Dr. Dr. G. Hobom, Gießen) mit *Hae*III verdaut (s. Abb. 3 B). Es entstehen Fragmente mit folgenden Längen (in bp): 1713, 1310, 890, 535, 460, 362, 352, 272, 223, 213, 212, 178, 142, 132, 83, 40.

2.1.6.3 Biotinylierter Molekulargewichtsmarker für Proteine

Als Molekulargewichtsmarker im Western Blot wurden "Biotinylated SDS-PAGE Standards, Low Range" (BioRad, München) verwendet (s. Abb. 3 C). Die enthaltenen Proteine haben Molekulargewichte von 97.4, 67.2, 45.0, 31.0, 21.5 und 14.4 kDa.



2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 *Zellspezifische Antikörper*

Es wurden die monoklonalen Antikörper der Maus *Anti-Pan Zytokeratin* Clone PCK-26 (Sigma, Deisenhofen) zur Abschätzung des Anteils epithelialer Zellen und *Anti-Vimentin* Clone Vim 13.2 (Sigma, Deisenhofen) zur Beurteilung der Kontaminationen mit Fibroblasten benutzt.

2.1.7.2 *Anti-IBDV-Antikörper*

Die in diesen Untersuchungen eingesetzten Antikörper standen am Institut für Virologie zur Verfügung. Bei dem polyklonalen Antikörper B54 handelt es sich um ein anti-23/82-Kaninchenserum, das mit dem Serotyp 1-Stamm Cu-1 ebenso gut reagiert wie mit dem Serotyp 2-Stamm 23/82 (MÜLLER 1987).

2.1.7.3 *Anti-Spezies-Antiseren*

Zum Nachweis von viralen Proteinen und intrazellulären Markern im indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) wurden FITC- oder TRITC-markierte Anti-Spezies-Antiseren, zum Nachweis von viralen Proteinen im Western Blot biotinylierte Anti-Spezies-Antiseren eingesetzt. Folgende Seren wurden verwendet: "Anti-Rabbit IgG FITC Conjugate" (Sigma, Deisenhofen), "Anti-Rabbit IgG TRITC Conjugate" (Sigma, Deisenhofen), „Anti-Mouse IgG FITC Conjugate" (Sigma, Deisenhofen), „Anti-Maus IgM FITC Conjugate“ (Sigma, Deisenhofen), „Anti-Maus biotinylated IgM“ (Sigma, Deisenhofen) und "Anti-Rabbit biotinylated IgG" (Sigma, Deisenhofen).

2.1.8 Oligonukleotide für die RT-PCR

Um die VP2 kodierende Region der in der Arbeit verwendeten Serotyp I-Stämme zu amplifizieren, wurden die Primer VP2R und VP2F verwendet. Der sense Primer VP2F (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC AAC AGC CAA CAT CAA CG-3') und der antisense Primer VP2R (5'-TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA CGC TCG AAG TTR CTC ACC C-3') wurden von Fa. Roth, Karlsruhe, bezogen. Das entstehende Fragment ist 723 bp groß (ZIERENBERG et al. 2001) im 1,5% Agarosegel (s. Abschnitt 2.2.13.1).

2.1.9 Vorgefertigte Systeme ("Kits")

In der vorliegenden Arbeit kamen Kits folgender Firmen zur Anwendung: *RNeasy Mini Kit*: Qiagen, Hilden; *Qiagen One Step RT-PCR Kit*: Qiagen, Hilden; *TA-Klonierung Kit*: Invitrogen, Eggenstein.

2.1.10 Lösungen, Puffer und Medien

Die Zusammensetzung der nachfolgend genannten Lösungen, Puffer und Medien ist im Anhang A, S. 131, beschrieben.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

2.2.1.1 *HEF-Zellkultur*

Primäre Zellkulturen aus HEF wurden nach Standardmethoden aus 10 Tage bebrüteten Hühnerembryonen hergestellt (DULBECCO u. VOGT 1954; YOUNGER 1954). Die Embryonen wurden entnommen, trypsiniert und die Zellsuspension durch sterile Gaze filtriert. Das Filtrat wurde in fetalem Kälberserum (FKS) aufgenommen und mit Kulturmedium auf eine Zelldichte von 8×10^5 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde die verdünnte Zellsuspension in Kulturschalen ausgesät und bis zur Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens (Monolayer) bei 38°C in einem CO₂-begasten Brutschrank ca. 24 -30 h inkubiert.

2.2.1.2 *Hühner-Embryo-Leberzellen (HEL-Zellen)*

Die embryonalen Lebern der 10 Tage bebrüteten Hühnerembryonen wurden entnommen und in PBS gewaschen. Für die Isolierung der HEL-Zellen wurden die unzerkleinerten Lebern 30 min in der Trypsin-EDTA-Lösung behandelt (1:100 der Stammlösung in GKN-2). Die Zellen wurden nach dem Zentrifugieren (3 min, 1000 x g) von dem Überstand getrennt, mit eiskaltem Williams' Medium E (WILLIAMS u. GUNN 1974) einmal gewaschen, nochmals wie zuvor zentrifugiert und in Wachstumsmedium resuspendiert. Die Kultivierung der embryonalen Hepatozyten fand im Williams' Medien E statt. Das Medium wurde mit 5% FKS, 6mM Glutamin (Gibco), 10mM Hepes, 10N NaOH 30 µl/100ml und 1:100 Penicillin-Streptomycin (Gibco) angereichert.

Nach der Vitalitätskontrolle und der Zellzahlbestimmung wurde die vorhandene Zellsuspension mit dem optimierten Williams' Medien E (s. oben) bis zu einer Endkonzentration von 4×10^6 Zellen/ml verdünnt. Die Zellen wurden in den gewünschten Gewebekulturschalen bei 38°C in einem 5% CO₂-begasten Brutschrank 2 Tage kultiviert. Das Medium wurde nach 48 h gewechselt. Als Erhaltungsmedium für die embryonalen Hepatozyten wurde FKS-freies William's Medium E mit 6mM Glutamin (Gibco) und 1:100 Penicillin-Streptomycin (Gibco) verwendet.

2.2.1.3 *CAM-Epithelzellen*

Nach 10 Bebrütungstagen wurde, nach der Entnahme des Embryos, die CAM von der Eischale mit der Pinzette entfernt und in einen Glasbecher gebracht. Das vorgewärmte GKN-1 wurde zugegeben, mit Hilfe einer Pinzette wurden die Membranen gerührt und in einen neuen Glasbecher übertragen. Danach wurde der Waschvorgang 2-3 Mal wiederholt, bis der Überstand klar blieb. Es erwies sich als günstig, maximal 15 Membranen pro Becher zu bearbeiten, sonst muss der doppelte Ansatz gemacht werden.

Gewaschene, unzerkleinerte Membranen wurden getrennt in den passenden Kolben übertragen und in einer Kollagenase-Hyaluronidase-Lösung (0,05% Stammlösung 1:5 in GKN-2) bei 38°C 1 h inkubiert. Die schnelle Abkühlung auf Eis oder im Kühlschrank erwies sich als vorteilhaft.

Um die CAM-Epithelzellen zu isolieren, wurde eine auf 37°C vorgewärmte, jeweils 1:200 mit GKN-2 verdünnte Trypsin-EDTA-Stammlösung (s. Anhang A) zugegeben und 5 min bei Zimmertemperatur gerührt, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde sorgfältig durch Dekantieren entfernt. Durch zwei wiederholte 10-minütige Trypsin-Versen-Behandlungen und Filtrieren wurden die CAM-Epithelzellen gewonnen. Die Zellen wurden nach dem Zentrifugieren (3 min, 1000 x g) von dem Überstand getrennt, mit eiskaltem Ham's F12 Medium einmal gewaschen, nochmals wie zuvor zentrifugiert und im Wachstumsmedium resuspendiert.

Eigenen Beobachtungen zur Folge musste die Temperatur der Trypsin-Versen-Lösung immer 37°C betragen, um ausreichende Ausbeute zu bekommen, und die isolierten Zellen mussten zwischen den Behandlungen und Bearbeitungen auf Eis aufbewahrt werden.

Zur Kultivierung der CAM-Epithelzellen wurde das serumfreie Ham's F12 Medium benutzt. Es war mit folgenden Supplementen angereichert: Na-Pyruvat 1:1000 (Gibco), Penicillin-Streptomycin 1:100 (Gibco), 10 mM Hepes, 10N NaOH 30 µl/100ml Medium. Das Medium mit dieser Zusammensetzung war im Kühlschrank haltbar und wurde weiter als F12-Basismedium bezeichnet. Das F12-Komplettmedium enthielt Insulin-Transferrin-Selenium 1:100 (Gibco), 5 µg/ml Insulin (Sigma), 5 nM Dexamethason (Serva), Synthetischer Serumersatz 1:1000 (Biochrom), 6mM Glutamin (Gibco). Die Zugabe dieser Stoffe zum F12-Basismedium musste vor der Aussaat der Zellen erfolgen.

Nach der Vitalitätskontrolle und der Zellzahlbestimmung wurde die vorhandene Zellsuspension mit dem entsprechenden Medium bis zu einer Endkonzentration von 4×10^6 Zellen/ml verdünnt. Die Zellen wurden in den gewünschten Gewebekulturflaschen bei 38°C und

in einem 5% CO₂-begasten Brutschrank 2 Tage kultiviert. Das Medium wurde nach 48 h gewechselt, bei den CAM-Epithelzellen mit dem 1,3 mM Ca²⁺-haltigen F12-Basismedium.

2.2.1.4 Proliferationsdynamik der CAM-Epithelzellen

Bei diesem Versuch wurde mittels einer Zellzählung bei Epithelzellkulturen die Abhängigkeit der Proliferationsaktivität vom Kulturmedium und dessen Zusatzstoffen geprüft. Es wurden in ein Loch der 12-Loch-Gewebekulturschale 2×10^6 Epithelzellen gegeben und nach 1 bzw. 2, 3, 4, 5, 6 Tagen p. inoc. die Zellzahl bestimmt. Danach wurde die PDT ermittelt. Die PDT ist die Zeit, in der die eingesetzte Zellzahl sich verdoppelt. Die PDT ist ein Gegenstück der Multiplikationsrate ($1/r$). Die Multiplikationsrate (r) ist die Zahl der Generationen, die pro Zeiteinheit entstehen und gewöhnlich als Zell-Verdopplung pro 24 h ausgedrückt wird.

PDT = Totalzeit des Wachstums einer Zellkultur/Zahl der Generation

PDT = $1/r$

Multiplikationsrate (r) = $3,32(\log N_H - \log N_1)/(t_2 - t_1) \rightarrow$ Generationszahl pro h

N_H - die nach der Wachstumsperiode geerntete Zellzahl

N_1 - die gegebene Zellzahl im Inokulum

$t_2 - t_1$ - Totalzeit des Wachstums einer Zellkultur (nach MCATEER u. DAVIS 2002)

2.2.1.5 Charakterisierung der CAM-Zellkultur

Die Morphologie der Zellen wurde nach 72 h im Lichtmikroskop analysiert. Dafür wurde der Zellrasen mit eiskaltem Methanol fixiert (-20°C, 15 min) und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Dazu wurde 0,5 ml der Giemsa-Farbe in 10 ml Aqua bidest. verdünnt, 1 ml dieser Lösung wurde zum Zellrasen gegeben und dieser 5 min färben lassen. Danach wurde die Farbe entfernt und der Zellrasen gründlich mit Aqua bidest. gewaschen und trocknen lassen.

Die Bestimmung der Kontamination mit Zellen nichtepithelialer Herkunft wurde in der Zellsuspension nach der Isolierung und in der Zellkultur jeweils nach 72 h vorgenommen. Dazu wurde eine Western blot-Analyse (s. Abschnitt 2.2.13.2), ein IIFT (s. Abschnitt 2.2.13.3) und die FACS-Analyse (s. Abschnitt 2.2.14) der entstehenden Zellsuspension durchgeführt.

2.2.2 Herstellung der Saatviren von Cu-1 und BD-3/99tc

Die Anzüchtung der Saatviren erfolgte in primären HEF-Kulturen nach der Methode von CURSIEFEN et al. (1979). Dazu wurden die in 16 cm-Petrischalen konfluent gewachsenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 5 ml Virussuspension ($\text{MOI} = 0,5$; in Kulturmedium ohne FKS verdünnt) infiziert. Nach einer Adsorptionsphase von 1 h bei 38°C wurde das Inokulum entfernt und durch 25 ml Kulturmedium ersetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 36 h bei 38°C für Cu-1 und 96 h bei 38°C für BD-3/99tc wurde das Virus durch dreimaliges Frieren (-20°C) und Tauen (Raumtemperatur) aus den Zellen freigesetzt. Danach wurden die Zelltrümmer für 10 min bei $3.345 \times g$ (Megafuge 1,0 R, Heraeus) abzentrifugiert, der Überstand gewonnen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Infektiosität des Saatvirus wurde im Plaquetest (s. Abschnitt 2.2.3) bestimmt.

2.2.3 Plaquetest

Zur Bestimmung der Infektiosität der verschiedenen IBDV-Saatviren wurden Plaquetests durchgeführt, so dass die Zellen in den folgenden Versuchen jeweils mit der gleichen Anzahl infektiöser Viruspartikel pro Zelle (Infektionsmultiplizität = MOI) infiziert werden konnten. Für die Erstellung von Vermehrungskurven wurde der Virustiter nach jeweils 0, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96 und 120 h p.i. durch Plaquetests bestimmt.

Mit der zu titrierenden Probe wurde eine zehnfache Verdünnungsreihe der Virussuspension in Kulturmedium (ohne FKS) hergestellt. Je zwei 6 cm-Kulturschalen mit HEF wurden nach einmaligem Waschen mit PBS mit 0,2 ml Virussuspension der jeweiligen Verdünnungsstufe beimpft und für 1 h bei 38°C mit intermittierendem Schwenken der Platten inkubiert. Nach Absaugen des Inokulums wurden die Zellen mit 4 ml Agar-Medium überschichtet und 3 Tage bei 38°C inkubiert. Die Plaques konnten nach Färbung der lebenden Zellen mit Neutralrot sichtbar gemacht und ausgezählt werden. Der Virustiter wurde in plaquebildenden Einheiten (PBE) pro ml unverdünnter Virussuspension angegeben.

2.2.4 Anzüchtung von hv-IBDV-Isolaten in Eiern

Da sich die hv-IBDV-Isolate nicht in Zellkulturen vermehren, erfolgte die Anzüchtung in embryonierten Hühnereiern nach Standardmethoden (COTTRAL 1978). Dabei ist für IBDV eine Beimpfung der CAM die effektivste Methode (TAKASE et al. 1996). Zuerst wurde die Lage der

Luftkammer von 10 Tage bebrüteten Hühnereiern über einer Kaltlichtquelle angezeichnet. Das Ei wurde horizontal gelegt und in Höhe des Embryos wurde ein Dreieck mit einer Kantenlänge von 1 cm, an der Luftkammer ein Kreis mit einem Durchmesser von 1-2 mm markiert. An den markierten Stellen wurde mit Hilfe eines Diamantschleifers bzw. einer scharfen Klinge die Kalkschale vorsichtig durchtrennt und nach Desinfektion mit einer Nadel entfernt, ohne die CAM zu zerstören. Nach der Erzeugung eines Unterdrucks mit Hilfe eines Saugballs an der Luftkammer entstand eine künstliche Luftkammer an der Eiseite. Durch diese Öffnung wurde die CAM mit 0,2 ml Virussuspension infiziert. Nach dem Verschließen der Löcher mit Holzleim wurden die Eier im Brutschrank bei 38°C inkubiert.

Die Isolierung des virushaltigen Materials erfolgte unter sterilen Bedingungen nach dem Absterben der Embryonen bzw. 6 Tage nach der Infektion. Dazu wurde das Ei am stumpfen Pol geöffnet und der Embryo und die CAM entfernt. Aus dem Embryo wurde die Leber entnommen und zusammen mit der CAM homogenisiert. Dieses Homogenat wurde dreimal bei -20°C gefroren, getaut und dann durch Ultraschallbehandlung für 5 x 10 sec (Stufe 4) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 10 min bei 3000 x g (Megafuge, Hereaus) wurde der Überstand gewonnen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Ermittlung der PBE/ml und der EID₅₀ infektiöser Materialien

Die PBE/ml infektiöser Suspensionen wurde im Plaquetest (s. Abschnitt 2.2.3) ermittelt. Die Titration von infektiösen Materialien zur Feststellung der EID₅₀/0,1ml fand in 11 Tage bebrüteten embryonierten Hühnereiern statt. Dabei wurden die CAM-Leber-Homogenate in einer zehnfachen Verdünnungsreihe in PBS verdünnt. Pro Verdünnungsstufe wurden sechs embryonierte Hühnereier inokuliert. Von dem verdünnten Material wurden jeweils 100 µl mit einer sterilen Spritze auf die CAM der embryonierten Eier gegeben. Sechs weitere Eier erhielten als Kontrolle 100 µl PBS in gleicher Art und Weise.

Die inokulierten Eier wurden sieben weitere Tage bebrütet, jeden Tag geschickt, die abgestorbenen Eier geöffnet und der Inhalt auf pathologische Veränderungen untersucht. Am siebten Tag nach Inokulation wurden auch die nicht abgestorbenen Eier geöffnet. Dabei wurde insbesondere auf folgende pathologisch-anatomische Veränderungen der Embryonen geachtet: abdominale Ödeme, petechiale Blutungen in der Haut, Farbe der Leber, Farbe der Milz, eventuelle Veränderungen der CAM.

Zur Bestimmung der EID₅₀ wurde die Formel von Spearman und Kaerber verwendet (MAYR et al. 1974). Die in den ersten 24 h abgestorbenen Embryonen wurden nicht mit einbezogen.

$\text{Log}_{10} \text{EID}_{50} - \text{Endpunkt-Verdünnung} = (x_0 - d/2 + d \sum r/n)$

x_0 – der \log_{10} des reziproken Wertes der niedrigsten Verdünnung, bei der alle Reagenten positiv sind;

d – der \log_{10} des Verdünnungsfaktors ($d = 1$ bei Verdünnungsfaktor 1:10)

n – Zahl der Reagenten, die für jede Verdünnung eingesetzt wurden (nach Abzug akzidenteller Todesfälle oder nichtablesbarer Reagenten);

r – die Anzahl der positiven Reagenten pro Gruppe.

2.2.6 Anzüchtung von IBDV in HEF-Kulturen, HEL-Kulturen und in CAM-Epithelzellen

Die Infizierung der Zellen wurde nach 48 h zusammen mit dem Wechsel des Mediums durchgeführt. Zuerst wurde der Zellrasen vorsichtig mit PBS gewaschen und ein frisches Medium zugegeben. Die Virusaliquote wurden aus der -80°C -Lagerung entnommen, 1:10 in PBS verdünnt und durch einen $0,2 \mu\text{m}$ -Filter steril filtriert. Von dem Filtrat wurde $0,2 \text{ ml}$ pro Loch in der 6-Loch-Gewebekulturschale zugegeben und 4 Tage bei 38°C inkubiert.

2.2.7 Extraktion der viralen RNA aus den infizierten Materialien

Die virale RNA für den Einsatz in der RT-PCR (s. Abschnitt 2.2.8) wurde aus infizierten Zellkulturen und Eiern mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.8 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde genutzt, um die Nachkommen der Viren in infizierten Kulturen nachzuweisen. Dies erforderte die reverse Transkription der RNA in cDNA und deren anschließende Amplifizierung mittels PCR nach einer von ZIERENBERG und Mitarb. (2001) beschriebenen Methode. Für die RT-PCR wurde der Qiagen One Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. In einem Reaktionsgefäß wurde der Prämix 1 angesetzt. Er enthielt jeweils $1 \mu\text{l}$ Primer (100 pmol) und ca. $1 \mu\text{g}$ Total-RNA in einem Gesamtvolumen von $20 \mu\text{l}$. Nach der 5-minütigen Denaturierung bei 95°C im Thermocycler und anschließendem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurde zu dem Prämix 1 der Prämix 2 hinzugegeben. Der Prämix 2 setzte sich aus $15,75 \mu\text{l}$ Aqua bidest., $10 \mu\text{l}$ 5 x RT-PCR-Puffer, $2 \mu\text{l}$ dNTP-Mix, $0,25 \mu\text{l}$ RNAsin (Ribonukleaseinhibitor, Promega, Mannheim) und $2 \mu\text{l}$ Enzym-Mix zusammen. Es schloss sich

eine 30-minütige Inkubation bei 50°C an, während der die RT stattfand. Nach erneuter Denaturierung bei 95°C für 15 min zur Aktivierung der „HotStartTaq™“-DNA-Polymerase folgten 40 Zyklen mit jeweils 30 sec bei 94°C, 1 min bei 58°C und 2 min bei 72°C. Abschließend wurde für 10 min bei 72°C inkubiert und der Ansatz auf 4°C gekühlt. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarose-Gel gereinigt (s. Abschnitt 2.2.10) und mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme (s. Abschnitt 2.2.11) analysiert.

2.2.9 Nachweis von DNA durch Agarose-Gel-Elektrophorese

DNA-Fragmente mit einer Länge von 100-15.000 bp können im Agarose-Gel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht werden. Universal-Agarose (PeqLab, Erlangen) wurde in TAE-Puffer in Konzentrationen von 0,8-2% (w/v) durch Aufkochen gelöst und in die vorbereiteten Gelkammern gegossen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 90-120 V, nachdem die DNA-Proben mit DNA-Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert worden waren. Anschließend wurde das Gel für ca. 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung getränkt und die DNA im Transilluminator unter UV-Licht ($\lambda = 366$ nm) sichtbar gemacht.

2.2.10 Reinigung von DNA-Fragmenten (Gene Clean)

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten bzw. PCR-Produkten für die REA wurde die DNA zunächst im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abschnitt 2.2.9). Die benötigten Banden wurden mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten, zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 ml NaJ-Lösung wurde die Agarose im Wasserbad bei 65°C geschmolzen. Danach wurden 10 µl Glasmilch hinzupipettiert und die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Glasmilch mit der gebundenen DNA wurde nun durch 2-minütige Zentrifugation bei 20.000 x g pelletiert und zweimal mit 200 µl New-Waschpuffer gewaschen. Das Pellet wurde in 30 µl Aqua bidest. resuspendiert und im Wasserbad 5 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde die Suspension für 4 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand mit der gelösten DNA gewonnen.

2.2.11 Klonierung von DNA

Die Klonierung von DNA für die REA wurde mit Hilfe des TA-cloning Kits (Invitrogen, Eggenstein) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.11.1 *Ligation*

Die Ligation wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die 10 µl Ligationsreaktion wurden 5 µl steriles Wasser, 1 µl 10 x Ligationspuffer, 2 µl pCR 2.1 Vektor (25 ng/µl), 1 µl des frischen PCR-Produkts und 1 µl T4-Ligase zusammengemischt. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert. Vor der weiteren Bearbeitung wurde dieser Ansatz abzentrifugiert und auf Eis aufbewahrt.

2.2.11.2 *Transformation mittels TA-cloning Kit*

Zu 25 µl der aufgetauten One shot[®]-kompetenten Zellen (auf Eis) wurden 2 µl des Ligationsansatzes gegeben und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Dieses Gemisch wurde auf Eis 30 min lang inkubiert. Danach erfolgte ein 30 sec langer Hitzeschock bei 42°C. Anschließend wurde das Gemisch 2 min auf Eis abgekühlt und es wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wurde 1 h mit 180 rpm bei 37°C geschüttelt und anschließend auf mit 100 µl IPTG und 80 µl XGal bestrichenen Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

2.2.12 Restriktionsenzymanalyse (REA)

Restriktionsendonukleasen spalten DNA sequenzspezifisch, so dass entweder glatte oder 3'- bzw. 5'-überhängende Enden entstehen. Somit können DNA-Sequenzen analysiert und Fragmente für die Klonierung erzeugt werden. Die Reaktionen wurden nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

Für die analytische REA mit einem Gesamtvolumen von 15 µl wurden 5 µl DNA-Lösung aus einer Plasmidpräparation mit einem oder mehreren Enzymen und dem entsprechenden Puffer gemischt und für 2 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert.

2.2.13 Nachweis von Proteinen

2.2.13.1 *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)*

Proteine können im denaturierenden Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt und anschließend im Western blot analysiert werden. Dazu wurde ein 12,5%-iges Trenn-Gel aus 2 ml Trenn-Gel-Puffer, 2,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (50:0,8), 100 µl 10% SDS, 3 ml 8M Harnstoff, 2,165 ml Aqua bidest., 225 µl APS und 10 µl TEMED hergestellt. Das Trenn-Gel wurde nach dem Polymerisieren mit dem Sammel-Gel, bestehend aus 500 µl Spacer-Gel-Puffer, 500 µl Acrylamid/Bisacrylamid (50:1,5), 50 µl 10 % SDS, 3 ml 8M Harnstoff, 850 µl Aqua bidest., 5 µl Pyronin G, 150 µl APS und 5 µl TEMED überschichtet. Die Proben wurden vor der SDS-PAGE mit dem Laemmli-Puffer versetzt (LAEMMLI 1970), 5 min gekocht und 2 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem Minigelsystem (Biorad, München) mit dem Glycin-Laufpuffer bei 150 V für 1,5 h.

2.2.13.2 *Western blot*

Die in der SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.2.13.1) aufgetrennten Proteine wurden in einer "semi dry"-Elektroblottingapparatur vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (KYHSE-ANDERSEN 1984) und anschließend durch eine immunlogische Reaktion nachgewiesen.

Das "Blotting" erfolgte bei 50 mA für 1,5 h. Die Membran wurde entnommen und die unspezifischen Bindungsstellen durch 1-stündige Inkubation in 5% Milchpulver in PBS-Tween (PBS-T) abgesättigt. Der primäre Antikörper (PCK-26; Vim 13.2; B54) wurde 1:1000 in PBS-T verdünnt und für 1 h auf die Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T schloss sich eine 45-minütige Inkubation mit dem biotinylierten Anti-Spezies-Antikörper (1:1000 in PBS-T) an. Die Membran wurde erneut dreimal mit PBS-T gewaschen und für 30 min mit Streptavidin-Peroxidase (1:2000 in PBS-T) inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS-T und einer mit PBS. Durch Zugabe des Chloronaphtol-Substrats wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht. Die Farbreaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit Aqua bidest. gestoppt.

2.2.13.3 *Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)*

Die Zellsuspension wurde auf sterile Deckgläschen in Kulturschalen ausgesät, 48 h angezüchtet und infiziert. Die Deckgläschen wurden zum gewünschten Zeitpunkt p.i. entnommen und kurz in PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 10 min in eiskaltem Aceton auf Eis fixiert und anschließend mit dem in PBS verdünnten spezifischen Antikörper (PCK-26 1:600, Vim 13.2 1:600, B54 1:100) für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen und Zugabe des FITC- oder TRITC-konjugierten Anti-Spezies-Antikörpers (1:100 in PBS) folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C. Nach erneutem zweimaligen Waschen in PBS und einem Waschschrift in Aqua bidest. wurden die Deckgläschen getrocknet und konnten im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Je nach verwendetem Anti-Spezies-Antikörper stellten sich die Antigene grün (FITC-konjugierter Antikörper) bzw. rot (TRITC-konjugierter Antikörper) dar.

2.2.13.4 *Nachweis viraler Antigene mittels Immunhistochemie (IHC)*

Von den eingebetteten CAM und der Leber wurden je 4 µm dicke Paraffinschnitte auf Objektträger (Superfrost®) aufgezogen und vor einem Ventilator getrocknet. Die Schnitte wurden 10 min und 5 min in Roti-Histol® entparaffiniert, gefolgt von 2 x 3 min in Isopropanol und 3 min in 96% Ethanol. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden die Gewebeschnitte für 30 min in 0,5% H₂O₂ (in Methanol) inkubiert und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe (96 - 70 - 50 - 25% Ethanol, je 3 min) und 3 min in Aqua bidest. rehydriert. Nach einmaligem Spülen in TBS für 5 min wurden die Schnitte mit Proteinase K (in Proteinase K-Puffer 1; 10 µg/ml) für 10 min bei 37°C behandelt. Anschließend wurde die Proteinase durch 2 x Waschen in Aqua bidest. inaktiviert. Die Objektträger wurden dann auf Coverplate™-System aufgebracht und in Sequenza-Einsätze eingesteckt. Die Gewebeschnitte wurden ü.N. bei 4°C mit dem polyklonalen Serum B54 (1:100 in TBS verdünnt) inkubiert. Der sekundäre Antikörper, biotinyliertes Anti-Rabbit IgG (1:100 in TBS verdünnt), wurde für 60 min bei 37°C mit den Schnitten im Coverplate™-System inkubiert, gefolgt von 30 min bei 37°C mit einem Streptavidin-POD-Konjugat (1:100 in TBS verdünnt). Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Proben jeweils 3 x 5 min mit TBS gewaschen. Als Substrat für die POD wurde entweder DAB (3-3'-Diaminobenzidin; DAB Substrate Kit for POD, Nachweis der Zytoskelettproteine) oder AEC-haltige Entwicklungslösung (Zymed; Nachweis des IBDV-Antigens) verwendet, wodurch sich Antikörper-bindende Zellen rot darstellen. Die

Entwicklung wurde unter dem Mikroskop beurteilt und die Färbung durch 5-minütiges Waschen in Wasser abgestoppt. Nach der Dehydrierung über eine aufsteigende Ethanolreihe (50 - 70 - 80 - 96 %, je 3 min), Isopropanol 2 x 3 min, Roti®-Histol 2 x 5 min wurden die Gewebeschnitte mittels Eindeckautomat Tissue Tek in Xylol (Institut für Veterinärpathologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig) eingedeckt.

2.2.14 Charakterisierung der Zellkulturen mittels Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse wurde zur Bestimmung der Kontamination mit Zellen nichtepithelialer Herkunft und zum Nachweis infizierter Zellen durchgeführt.

Der Zellrasen wurde einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit dem Trypsin-Versen Puffer von den Plastikoberflächen abgelöst und in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß gesammelt, pro Probe ca. 10^6 Zellen. Die Zellen wurden dann bei $1000 \times g$ 8 min pelletiert, die Trypsin-Versen Lösung entfernt und die Zellen im FACS-Puffer gewaschen und wieder abzentrifugiert. Die primären Antikörper (PCK-26, Vim 13.2, B54) wurden 1:50 im FACS-Triton-Puffer verdünnt und 50 µl zu dem Pellet gegeben. Die folgende Inkubation fand 1 h auf Eis statt. Danach wurden die Proben dreimal mit dem FACS-Puffer jeweils 15 min pro Waschvorgang gewaschen und bei $1000 \times g$ 8 min abzentrifugiert. Als sekundärer Antikörper wurden 50 µl Anti-Spezies-Antikörper als FITC-Konjugate in der Verdünnung 1:200 zum FACS-Triton-Puffer zugegeben. Die weitere Inkubation fand 30 min im Dunkeln, jeweils auf Eis, statt. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Nach der letzten Pelletierung wurde der FACS-Puffer möglichst vollständig entfernt und das Pellet wurde in 0,3 einer ml FACS-Fixierungslösung resuspendiert. Bis zu der FACS-Analyse wurden die Proben auf Eis bei 0°C im Dunkeln gelagert. Das Zellfluoreszenzsignal wurde im Institut für Veterinärimmunologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung einer Zellkultur aus der CAM von Hühnereiern

3.1.1 Nachweis der keratinhaltigen Zellen in der CAM

Um zunächst einen Einblick in die Epithelschichten der CAM zu erhalten, wurde die CAM nach 10 Bebrütungstagen mittels immunhistologischem Nachweisverfahren (s. Abschnitt 2.2.13.4) untersucht. Die Schnitte wurden mit dem polyklonalen Anti-Pan-Zytokeratin Antikörper PCK-26 inkubiert. In der Substrat-Reaktion waren Keratin-positive Zellen im Lichtmikroskop durch eine braune Färbung ihres Zytoplasmas erkennbar (s. Abb. 4 A, B, Pfeile). Da sich nur geringe Mengen an Epithelzellen am Membranrand befanden, wurde entschieden, die unzerkleinerte CAM zu bearbeiten. Dadurch sollte die Epithelschicht nicht beschädigt werden und durch eine schonende Bearbeitung der CAM konnten die obenliegenden Epithelzellen gewonnen werden.

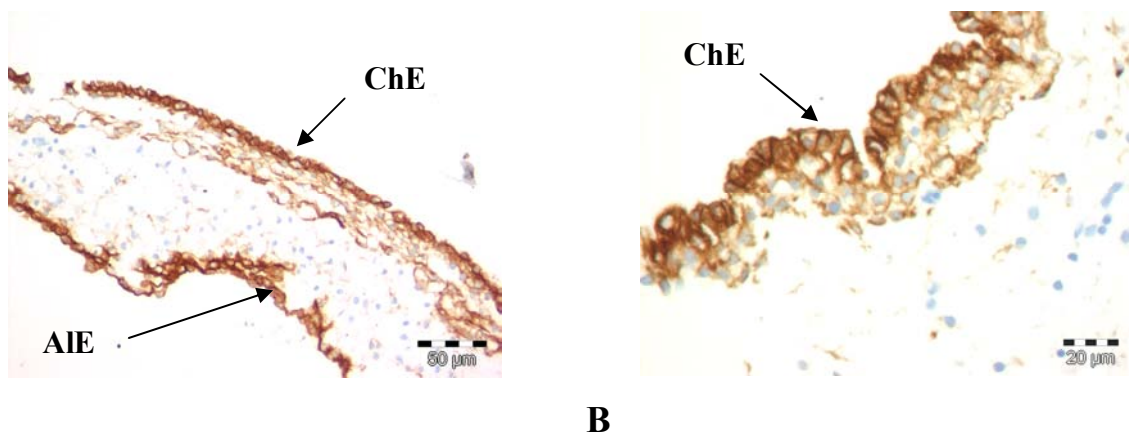


Abbildung 4: Querschnitt durch die Chorioallantoismembran eines 10 Tage lang bebrüteten Hühnereies: x 20 (A); x 50 (B). Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen Anti-Pan-Zytokeratin Antikörper (Clone PCK-26). Keratin-positive Zellen stellen sich in der Substrat-Reaktion durch die braune Färbung ihres Zytoplasmas dar. **ChE** – Chorionepithel; **AIE** – Allantoisepithel.

3.1.2 Auswahl des Digestionsverfahrens

Um die Zellkulturbedingungen für die weiteren Versuche zu standardisieren, ist die Isolation der Epithelzellen aus der CAM ein wesentlicher Prozess. Deshalb wurden Trypsin, Trypsin-EDTA, Kollagenase Typ I, Hyaluronidase und deren Kombinationen getestet (s. Tab. 1).

Außer der enzymatischen Behandlung mit 0,25% Trypsin (s. Tab. 1, Spalte 1) wurde in allen Versuchen eine zweistufige Bearbeitung des Materials vorgenommen (s. Tab. 1, Spalte 2, 3, 4, 5). Die mit GKN-1 gewaschenen Membranen wurden in einen passenden Kolben gegeben und mit der entsprechenden Enzymlösung bedeckt (ca. 10 ml Lösung pro 1 g Gewebematerial). Danach erfolgte eine einstündige Inkubation in einem Brutschrank bei 38 °C. Die mechanische Bearbeitung der Membranen fand ohne Erneuerung der Enzymlösung mit Hilfe eines Magnetsstabs auf einem Magnetprüher statt. Die Bearbeitungszeit betrug jeweils 10, 20 oder 30 min.

Bei einem anderen Versuch (s. Tab. 1, Spalte 6) wurde eine zweistufige Bearbeitung der CAM durchgeführt. Als erstes wurde eine einstündige Inkubation mit 0,01% Kollagenase- und 0,001% Hyaluronidase-haltigem GKN-2 bei 38°C vorgenommen. Im zweiten Schritt wurde eine fraktionierte enzymatische Behandlung durchgeführt. Die CAM wurden dreimal jeweils 5 min, 10 min und weitere 10 min mit Trypsin-EDTA in GKN-2 mit Hilfe eines Magnetsstabs auf einem Magnetprüher behandelt, wobei die erste fünfminütige Behandlung zur Entfernung der abgestorbenen Zellen diente und diese Zellausbeute nicht weiter benutzt wurde. Die nach zwei weiteren 10-minütigen Behandlungen erhaltenen Zellfraktionen wurde gesammelt und weiter bearbeitet.

Die isolierten CAM-Epithelzellen wurden im Ham's F12-Medium mit 5% FKS bis zu Konzentrationen von 4×10^6 Zellen/ml verdünnt und bei 38°C inkubiert. Von Interesse waren die folgenden Parameter: die Dauer der Enzymbehandlungen und der überwiegende Zelltyp im Zellrasen.

Die Zelltypbestimmung wurde am fixierten und mit Giemsa gefärbten Zellrasen nach 48 h unter dem Umkehr-Lichtmikroskop durchgeführt. Zellen wurden nach ihrer Morphologie und ihrem Anteil im Zellrasen in der Form – bis ++++ (s. Tab. 1) bewertet. Die CAM-Epithelzellen waren sehr dicht miteinander verbunden, rund und hatten einen großen Zellkern. Die Fibroblasten waren spindelförmig mit einem kleinen Zellkern.

Die Analyse der Ergebnisse zeigte, dass die Trypsin- oder Trypsin-EDTA-Behandlung allein zu einem größeren Anteil an Fibroblasten führte (s. Tab. 1, Spalte 1, 2). Andererseits lässt sich nur durch Kollagenase- und/oder Hyaluronidase-Behandlung nicht die gewünschte

Zellpopulation gewinnen (s. Tab. 1, Spalte 3, 4, 5). Bessere Ergebnisse wurden bei der fraktionierten enzymatischen Behandlung der CAM erzielt (s. Tab 1, Spalte 6). Bei der Anwendung der fraktionierten enzymatischen Behandlung gelang es, eine Zellpopulation zu gewinnen, die vorwiegend aus vermehrungsfähigen Zellen epithelialer Herkunft bestand (s. Tab 1, Spalte 6).

| Tabelle 1: Optimierung der enzymatischen Behandlung der CAM | | | | | |
|--|-----------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------|---------------|
| Enzym | Konzentration (%) | Reaktionszeit (min) | | Zelltyp * | |
| | | Inkubation im Brutschrank (38°C) | Enzymatische Behandlung bzw. Rühren | Fibroblasten | Epithelzellen |
| 1. Trypsin | 0,25 | 0 | 60 | ++++ ** | -- |
| 2. Trypsin-EDTA | 0,0125 | 60 | 10 | +++ | + |
| | | | 20 | +++ | + |
| | | | 30 | ++++ | -- |
| 3. Kollagenase | 0,01 | 60 | 10 | +++ | + |
| | | | 20 | +++ | + |
| | | | 30 | +++ | + |
| 4. Hyaluronidase | 0,001 | 60 | 10 | +++ | + |
| | | | 20 | +++ | + |
| | | | 30 | +++ | + |
| 5. Kollagenase + Hyaluro-nidase | 0,01+0,001 | 60 | 10 | ++ | ++ |
| | | | 20 | +++ | + |
| | | | 30 | +++ | + |
| 6. Kollagenase + Hyaluronidase/ Trypsin - EDTA | 0,01+0,001/ 0,0125 | 60 | 5, 10, 10 | - | ++++ |
| <p>* Die isolierten CAM-Epithelzellen wurden im Ham's F12-Basismedium mit 5% FKS bis zu Konzentrationen von 4×10^6 Zellen/ml verdünnt und bei 38°C 48 h inkubiert:</p> <p>** +++++ - 75-100% der Zellen im Zellrasen gehören zu einem Zelltyp</p> <p>+++ - 50-75% der Zellen im Zellrasen gehören zu einem Zelltyp</p> <p>++ - 25-50% der Zellen im Zellrasen gehören zu einem Zelltyp</p> <p>+ - bis 25% der Zellen im Zellrasen gehören zu einem Zelltyp</p> | | | | | |

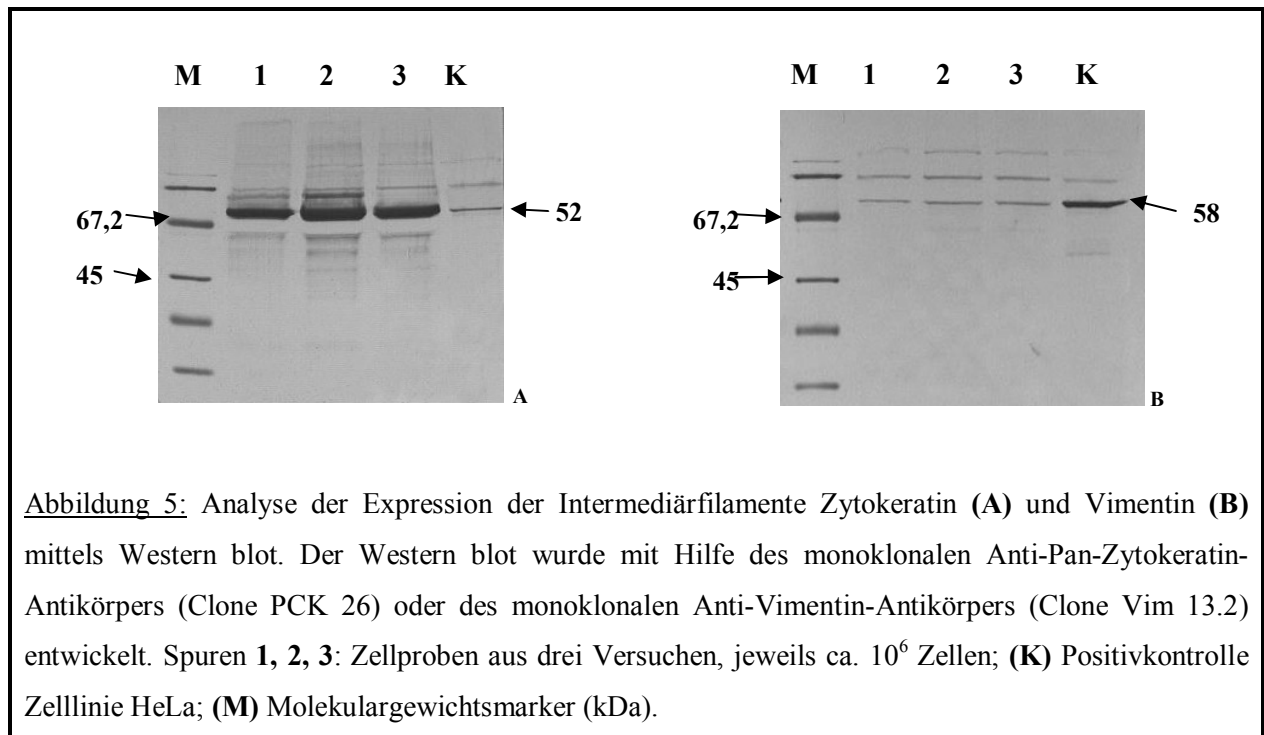
3.1.3 Expression von Zytokeratin und Vimentin in frisch isolierten CAM-Epithelzellen

3.1.3.1 *Nachweis von Zytokeratin und Vimentin mittels Western blot*

Mittels Western blot sollte gezeigt werden, ob das ausgewählte fraktionierte Digestionsverfahren (s. Abschnitt 3.1.2) vorwiegend die Gewinnung der epithelialen Zellen ermöglicht. Die Charakterisierung erfolgte mit einem Zell-Lysat (ca. 10^6 Zellen pro Probe) der frisch isolierten CAM-Epithelzellen (s. Abschnitt 2.2.13.1, 2.2.13.2). Je nach Zielstellung wurde der Western blot mit Hilfe des polyklonalen Anti-Pan-Zytokeratin Antikörpers (Clone PCK 26) oder des monoklonalen Anti-Vimentin- Antikörpers (Clone Vim-13.2) entwickelt.

Das Proteinmuster des Zytokeratins weist darauf hin, dass die Epithelzellen im Zell-Lysat überwiegen (s. Abb. 5 A). Die Abbildung 5 (B) zeigt, dass der Gehalt der vimentinhaltigen Zellen im Vergleich zu den keratinhaltigen Zellen sehr gering ist. Die Proteinbanden des Vimentins sind sehr schwach. Als eine positive Kontrolle wurde die Zelllinie HeLa ausgewählt. Die HeLa-Zelllinie stammt aus einem Zervixkarzinom der Frau, deshalb exprimieren Zellen beide Zellmarker (UPASANI et al. 2004; ROBERTSON et al. 2005).

Da der monoklonale Antikörper Anti-Pan-Zytokeratin (Clone PCK-26) gegen CK1 (68 kDa), CK5 (58 kDa), CK8 (52 kDa) und CK6 (56 kDa) gerichtet ist und die HeLa-Zellen das CK8 exprimieren (UPASANI et al. 2004), wurde es möglich festzustellen, dass die CAM-Epithelzellen vorwiegend CK8 (s. Abb. 5 A) exprimieren. Das CK8 ist das am meisten vorkommende Typ II-Zytokeratin des einschichtigen Epithels. Die CAM-Epithelschicht gehört zum einschichtigen Epithel. Dieser Versuch bestätigt, dass das von uns ausgewählte Digestionsverfahren vorwiegend die Gewinnung der Epithelzellen aus der CAM ermöglicht.



3.1.3.2 FACS-Analyse der entstandenen Zellsuspension

Die Zusammensetzung der frisch isolierten Zellsuspension wurde parallel mittels Durchflusszytometrie untersucht. Da bei der Isolierung der CAM-Epithelzellen die fraktionierte enzymatische Behandlung vorgenommen wurde (s. Abschnitt 3.1.2), wurde die FACS-Analyse der beiden Fraktionen getrennt durchgeführt. Damit sollte weitere Gewissheit erhalten werden, dass diese Methode für die Gewinnung der CAM-Epithelzellen am besten geeignet ist.

Bei der Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen kann die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen gemessen werden. Somit ermöglicht diese Methode sowohl die quantitative und qualitative Bestimmung zellulärer Parameter einzelner Zellen, als auch die Analyse der gesamten Zellsuspension. Die Zellen wurden mit den Zellmarker-spezifischen Antikörpern entweder, PCK-26 oder Vim 13.2, inkubiert und anschließend mit dem FITC-markierten Anti-Maus-Antikörper gefärbt. Die Fluoreszenzintensität von 10^4 eingesetzten Zellen wurde mittels FACS gemessen.

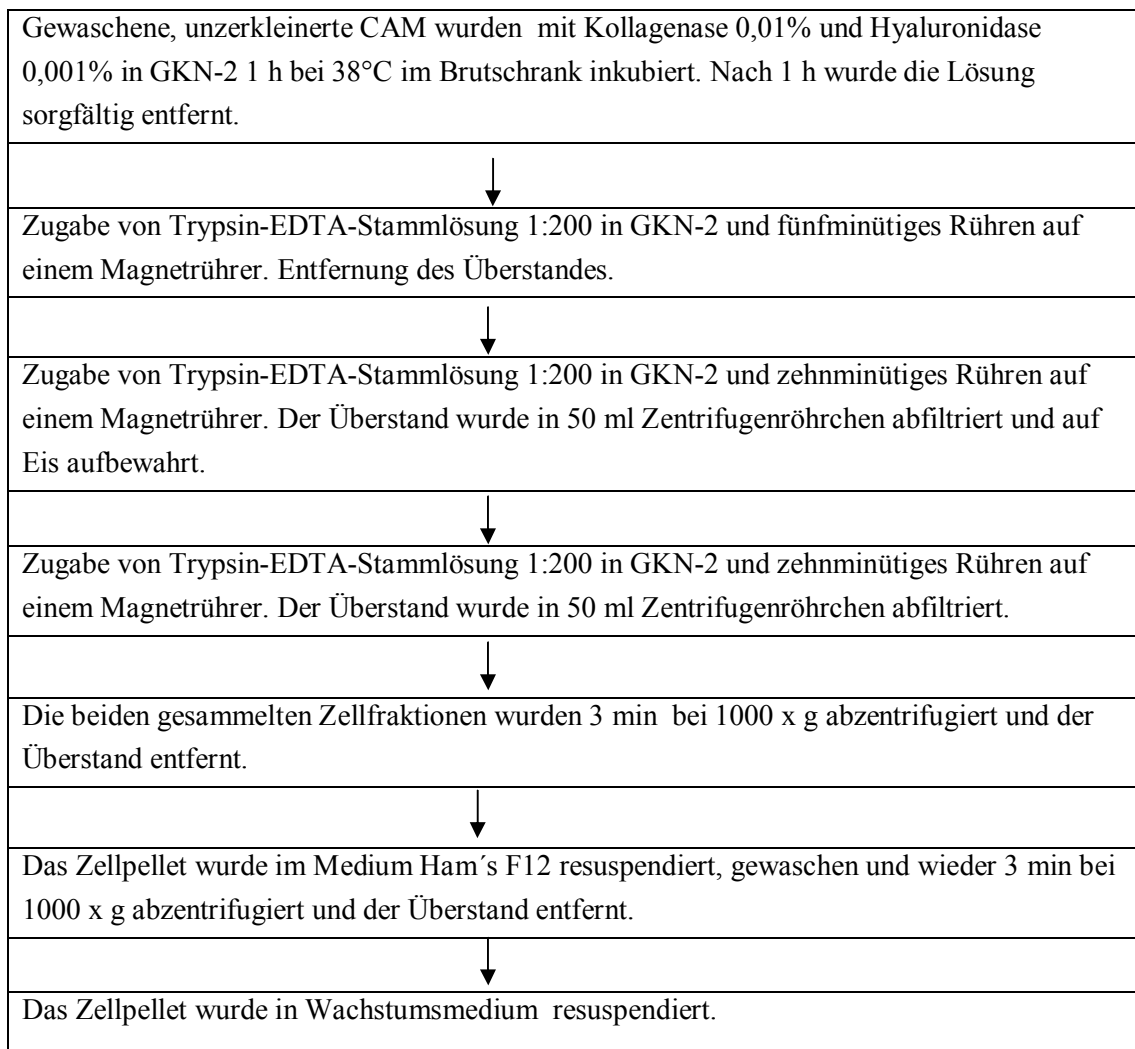
Um den fluoreszierenden Hintergrund beurteilen zu können, wurde als Kontrolle nur die Fluoreszenz der mit dem FITC-markierten Antikörper gefärbten Probe gemessen (s. Abb. 6 A). Diese Zellen befinden sich im Bereich R_2 . Weiterhin werden die Zellen, die im Bereich R_2 zu finden sind, aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Sie gelten als „unspezifisch gefärbte Zellen“. Die Ergebnisse wurden nach der Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen in der Abbildung 6 zusammengestellt. Die CK-positiven Zellen haben eine Fluoreszenzintensität

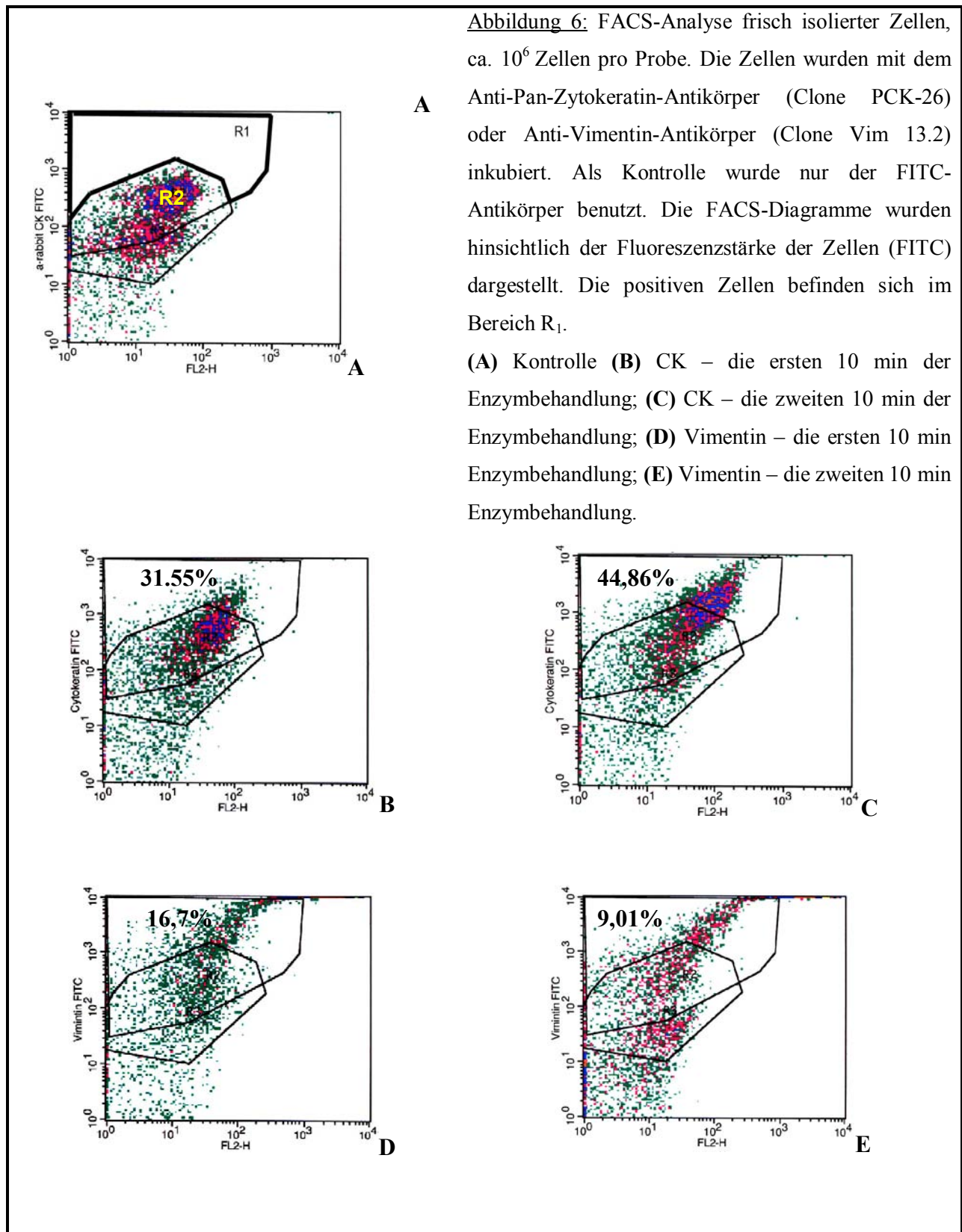
zwischen 10^2 und 10^4 und deswegen platzierten sie sich im Bereich R_1 . Dieser Bereich ist dick markiert (s. Abb. 6 A).

Die FACS-Analyse ergibt, dass bis zu 45% der Zellen in der Suspension CK-positiv bzw. epithelialer Herkunft sind (s. Abb. 6 B, C). Auch der intrazelluläre Marker der Stromazellen (Vimentin) wurde nachgewiesen. Als Ergebnis dieses Versuches stellte sich heraus, dass es sich um eine gemischte Zellpopulation handelt. Obwohl die Zellpopulation hauptsächlich aus Epithelzellen besteht, beträgt der Anteil der vimentinhaltigen Zellen bis zu 17% (s. Abb. 6 D, E).

Somit wird nochmals bestätigt, dass die dünne Epithelschicht der CAM eine schonende und kurze Bearbeitungszeit erfordert. Im Zusammenhang mit der Western blot-Analyse (s. Abschnitt 3.1.3.1, Abb. 5) lässt sich schlussfolgern, dass die vorgeschlagene Isolationsmethode am besten zur Isolation der CAM-Epithelzellen geeignet ist. Die Reihenfolge der enzymatischen Behandlungen der CAM ist im Schema 1 dargestellt.

Schema 1: Schematische Darstellung der enzymatischen Behandlung der CAM





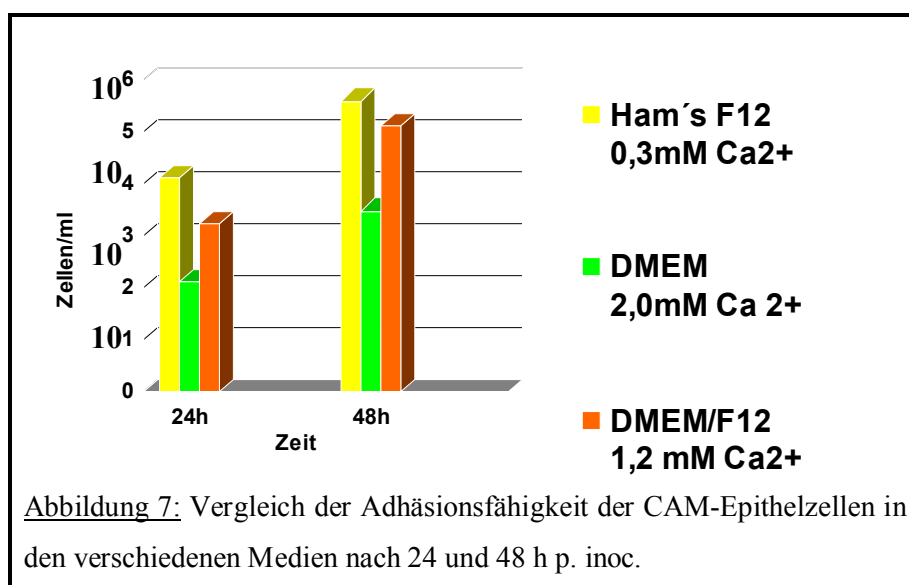
3.1.4 Optimierung des epithelspezifischen Mediums

Da es sich bei der Gewinnung aller Arten der Epithelzellen immer um eine gemischte Zellpopulation handelt, besteht die Aufgabe darin, den Anteil der Stromazellen so niedrig wie möglich zu halten und das gezielte Wachstum der Epithelzellen zu fördern.

3.1.4.1 *Auswirkung des Ca^{2+} -Gehaltes auf die Adhäsionsfähigkeit der CAM-Epithelzellen*

Da das Ca^{2+} für die Zelladhäsion der Epithelzellen besonders wichtig ist, war es interessant, die Medien mit verschiedenen Ca^{2+} -Gehalten zu prüfen und zu sehen, ob die Zelladhäsion gefördert wird. Von Interesse waren die drei am meisten benutzten Medien: DMEM, DMEM/F12, Ham's F12. Diese Medien enthalten nach Standard-Rezeptur 2,0 mM Ca^{2+} , 1,2 mM Ca^{2+} und 0,3 mM Ca^{2+} (s. Abb. 7).

In diesem Versuch wurde die Adhäsion der Zellen untersucht. Alle drei Medien wurden mit 5% FKS-Gehalt, aber ohne weitere Zusätze, verwendet. Die Zellsuspension wurde auf 4×10^6 Zellen/ml verdünnt und 1 ml davon wurde in ein Loch der 12-Loch-Gewebekulturschale gegeben und im einem 5% CO_2 -begasten Brutschrank bei 38°C inkubiert. Die auf der Gewebekulturschale adhärenen Zellen wurden nach 24 h und 48 h p. inoc. mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und gesammelt, die Zellzahl bestimmt und somit der Einfluss des Mediums analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.



Aus dem Diagramm in Abbildung 7 ist ersichtlich, dass eine bessere Adhäsion der CAM-Epithelzellen beim Ham's F12 ermittelt wurde (gelbe Säule). Nach 24 h p. inoc. waren 10^4 und

nach 48 h 5×10^5 CAM-Epithelzellen an der Gewebekulturschale angeheftet. Die Adhäsionsrate der CAM-Epithelzellen betrug im Ham's F12 Medium nach 48 h p.inoc. ca. 10%. Ausgehend von den biologischen Eigenschaften der CAM-Epithelzellen war dieses Ergebnis ausreichend.

Das DMEM mit höherem Ca^{2+} -Gehalt unterdrückt die Haftung der CAM-Epithelzellen (s. Abb. 7, grüne Säule). In diesem Medium wurde eine Adhäsionsrate der CAM-Epithelzellen von ca. 0,1% nach 48 h p.inoc. ermittelt. Dieser Versuch bestätigt, dass das Ham's F12-Medium am besten für die CAM-Epithelzellen geeignet ist.

Basierend auf Veröffentlichungen (BERTOLERO et al. 1984; BERTOLERO et al. 1986; VAN MUIJEN et al. 1987; SEO et al. 2004; ANG et al. 2004) und den Beobachtungen zur Folge war die Zugabe von Ca^{2+} nach 48 h post Inokulation für die CAM-Epithelzellen notwendig. Dadurch wird sowohl eine bessere Haftung der Zellen an die Gewebekulturschale als auch eine Förderung der Zellteilung und Differenzierung erreicht. Deswegen wurde 1 mM Ca^{2+} zu dem F12-Basismedium zugegeben, und die Endkonzentration betrug dann 1,3 mM Ca^{2+} . Dieses Medium mit dem erhöhten Ca^{2+} -Gehalt wurde weiter als Erhaltungsmedium bei der Virusanzucht verwendet.

3.1.4.2 *Optimierung der Zusatzstoffe*

Die Züchtung der Epithelzellen unter serumhaltigen Bedingungen könnte ein unerwünschtes Wachstum der Fibroblasten hervorrufen. Da die Zugabe von Zusätzen noch gezielter eine besondere Zellart unter serumfreien Bedingungen fördern könnte, war es interessant, eine für die CAM-Epithelzellen optimierte Mediumzusammensetzung zu finden. Die zumeist benutzten Zusätze und deren Konzentrationen sind im Abschnitt 1.4.1 beschrieben. Die Mitogene und Wachstumsfaktoren wurden, entsprechend den Literaturangaben (GUIDRY et al. 1998; FUJIE et al. 1996; RÖPKE 1997), zum serumfreien Ham's F12-Medium hinzugefügt: 1:1000 Na-Pyruvat; 6 mM Glutamin; 1:100 Penicillin-Streptomycin 1:100; 10 mM Hepes; 10N NaOH 30 μl /100ml. Das so supplementierte Medium wurde weiter als F12-Basismedium bezeichnet. Um eine Aussage über die positive Auswirkung dieses Mediums auf die Zellvermehrung zu erhalten, wurde die PDZ während der ersten vier Kultivierungstage ermittelt (s. Tab. 2). Die Zellgenerationszahl wurde während der ersten vier und während der zweiten vier Kultivierungstage ermittelt (s. Tab. 3).

Tabelle 2: Population doubling time der CAM-Epithelzellen während der ersten 4 Kultivierungstage im Ham's F12-Basismedium mit verschiedenen Supplementen.

| Medium | PDT |
|-------------------------------|------------|
| F12-Basismedium | 18,00±0,82 |
| F12-Basismedium + 10% FCS | 17,34±0,10 |
| F12-Basismedium + 5F* | 16,77±0,41 |
| F12-Basismedium + 5F +EGF | 16,20±0,23 |
| F12-Basismedium + 5F+ 2,5%FKS | 16,74±0,18 |
| F12-Basismedium + 5F + 5%FKS | 17,90±0,66 |

*5F – 5 Faktor: Insulin 5 µg/ml, ITS 1:100, synthetischer Serumersatz 1:1000 und Dexamethason 5 nM

Tabelle 3: Wachstum der CAM-Epithelzellen in Ham's F12-Basismedium mit verschiedenen Supplementen.

| Medium | 1. - 4. Kultivierungstag | 5. - 8. Kultivierungstag |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Zellgenerationen | Zellgenerationen |
| F12-Basismedium | 5,35±0,26 | 0,02±0,009 |
| F12-Basismedium + 10% FCS | 5,55±0,03 | 0,16±0,058 |
| F12-Basismedium + 5F** | 5,81±0,10* | 0,76±0,081* |
| F12-Basismedium + 5F +EGF | 5,96±0,08* | -0,14±0,017 |
| F12-Basismedium + 5F+ 2,5%FKS | 5,75±0,09* | -0,71±0,032 |
| F12-Basismedium + 5F + 5%FKS | 5,39±0,16 | 0,02±0,001 |

*P≤0,05

**5F – 5 Faktor: 5 µg/ml Insulin, ITS 1:100, synthetischer Serumersatz 1:1000 und 5 nM Dexamethason

Die Supplementierung des F12-Basismediums mit Insulin 5 µg/ml, ITS 1:100, synthetischem Serumersatz 1:1000 und Dexamethason 5 nM (sog. 5 Faktor, weiter als 5F bezeichnet) ermöglicht ein positives Wachstum der CAM-Epithelzellen. In den ersten vier Inkubationstagen wurden im F12-Basismedium + 5F 5,8 Zellgenerationen ermittelt (s. Tab 3, Spalte 3) und die PDT betrug 16,8 h (Tab. 2, Spalte 3). Die CAM-Epithelzellen wachsen

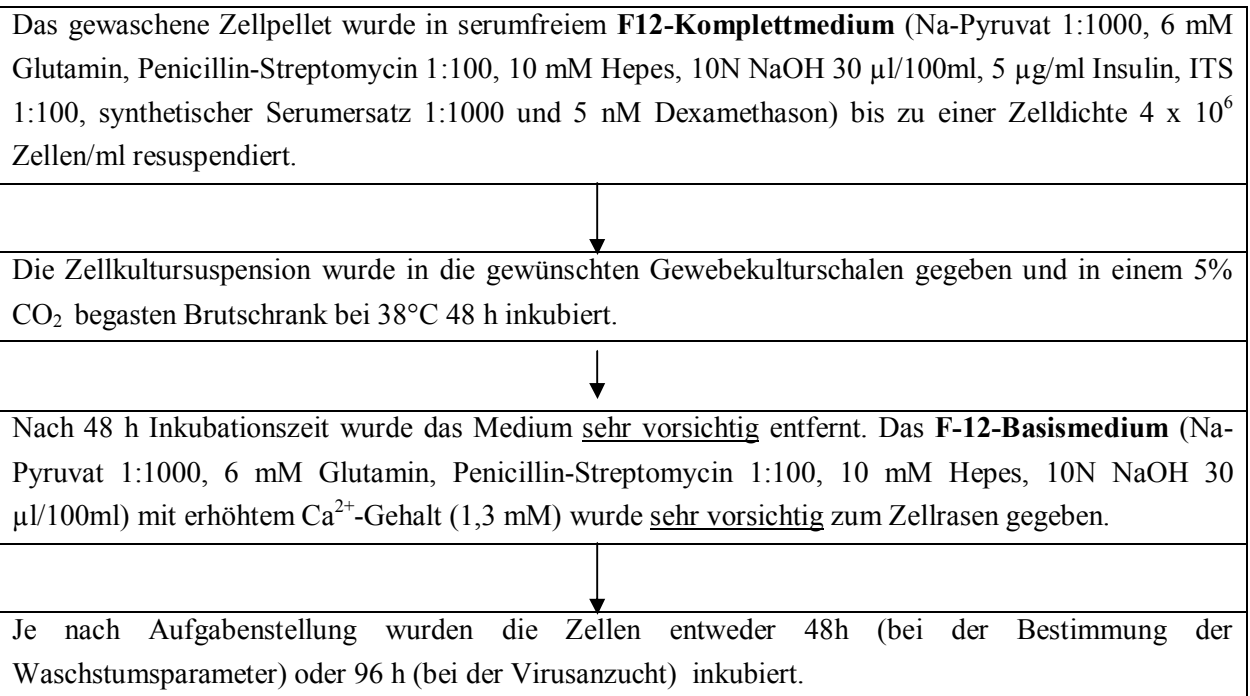
langsam und haben eine kurze Lebensdauer. Für die weiteren virologischen Untersuchungen war es wichtig, die CAM-Epithelzellen über die ganze Kultivierungszeit am Leben zu halten. Im F12-Basismedium + 5F befanden sich die Epithelzellen zwischen dem 5. und dem 8. Kultivierungstag in der Plateau-Phase, d. h., die Zellen waren noch am Leben, aber sie teilten sich entweder sehr langsam oder nicht mehr. In diesem Fall wurden 0,7 Zellgenerationen ermittelt (s. Tab. 3, Spalte 3). Das spricht für die guten Wachstumsbedingungen dieser Zellkultur. Die Ergebnisse, die bei der Benutzung des Ham's F12 + 5F Medium erzielt wurden, sind als statistisch signifikant zu bewerten ($P \leq 0,05$).

Die Zugabe von FKS (2,5%, 5% oder 10%) zeigte keine deutlich unterschiedlichen Ergebnisse in den ersten vier Kultivierungstagen. Ein deutlicher Unterschied in der Zellvermehrung war jedoch in der 2. Kultivierungshälfte zu sehen. Die Generationszahl deutet darauf hin, dass die Zellen unter serumhaltigen Bedingungen entweder aufhörten sich zu teilen (0,02 Generationen bei 5%-igem FKS-Gehalt, s. Tab. 3, Spalte 6, und 0,2 - bei 10%-igem FKS-Gehalt, s. Tab. 3, Spalte 2) oder anfangen abzusterben (-0,71 Generationen bei 2,5%-igem FKS-Gehalt, s. Tab. 3, Spalte 5). Da die CAM-Epithelzellen über die ganze Kultivierungszeit am Leben gehalten werden mussten, war dieser Zustand des Zellkultursystems für die weiteren virologischen Untersuchungen unerwünscht.

Die Zugabe der EGF (10 ng/ml) als Mitogen zeigte zwar eine kurze PDT (16,2 h, s. Tab. 2, Spalte 4), aber es war auch ein früheres Absterben der Zellen zu beobachten. Zwischen dem 5. und dem 8. Tag wurde eine negative Bilanz festgestellt (-0,14 Generationen, s. Tab. 3, Spalte 4). Diese negative Bilanz deutet darauf hin, dass die Zellkultur in dieser Zeit anfang abzusterben. Demgegenüber wiesen die Zellen im Ham's F12 + 5F Medium eine langsame Vermehrung auf (0,7 Generationen).

Ein andere Schlussfolgerung ist aus diesem Versuch zu ziehen: Die Wachstumsparameter (PDT, Generationszahl) hängen viel mehr von den biologischen Eigenschaften der Zellen ab als von den Zellkulturkonditionen. Trotzdem ist es gelungen, die günstigsten Wachstumsbedingungen für die CAM-Epithelzellen zu finden. Die optimierte Mediumzusammensetzung und dessen Anwendung sind im Schema 2 dargestellt.

Schema 2: Optimiertes epithelspezifisches Medium und seine Anwendung für die Anzucht von CAM-Epithelzellen



3.1.5 Zelltypbestimmung

3.1.5.1 Expression von Zytokeratin und Vimentin *in vitro*

Dieser Versuch sollte zeigen, welcher Zelltyp überwiegend im Zellrasen nach 48 und 96 Inkubationsstunden zu finden ist. Auch sollte bestätigt werden, dass die Mediumsauswahl (F12-Basismedium + 5F, s. Abschnitt 3.1.4.2) das Wachstum der Epithelzellen fördert. Zusätzlich wurden noch drei weiteren Zusammensetzungen (F12-Basismedium + 5F + EGF; F12-Basismedium + 5F + 2,5% FKS; F12-Basismedium + 5F + 5% FKS) des Mediums auf die Unterstützung des Wachstums der CAM-Epithelzellen untersucht. Das F-12-Basismedium und F-12-Basismedium + 10% FKS wurden aus weiteren Untersuchungen ausgenommen. Im Western blot wurden ca. 10^6 Zellen untersucht. Das entspricht ca. 1/10 der gesamten Zellpopulation im Falle der Benutzung einer 6-Loch-Gewebekulturschale.

Eine steigende Expression des Zytokeratins nach 96 Inkubationsstunden spricht sowohl für die Vermehrung der Zellen als auch für ihre zunehmende Differenzierung (s. Abb. 8 A). Das Zytokeratin ist ein Marker der Zelldifferenzierung. Die differenzierten Zellen teilen sich nicht mehr. Wie schon gezeigt wurde (s. Abschnitt 3.1.4.2, Tab. 3), sind die Zellen zwischen dem 5. und 8. Kultivierungstag in der Plateau-Phase.

Der Vergleich des nachgewiesenen Zytokeratin mit der Menge des Vimentins (s. Abb. 8 B) bestätigt, dass der Zellrasen überwiegend aus CAM-Epithelzellen besteht. Der kleinere Anteil der Stromazellen stellte keine Beeinträchtigung der weiteren Untersuchungen dar.

Alle geprüften Medien fördern die Vermehrung der CAM-Epithelzellen. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen, die im Abschnitt 3.2.4.2 zu sehen sind, wurde für die Bearbeitung der weiteren Fragestellungen für das F12-Basismedium + 5F entschieden.

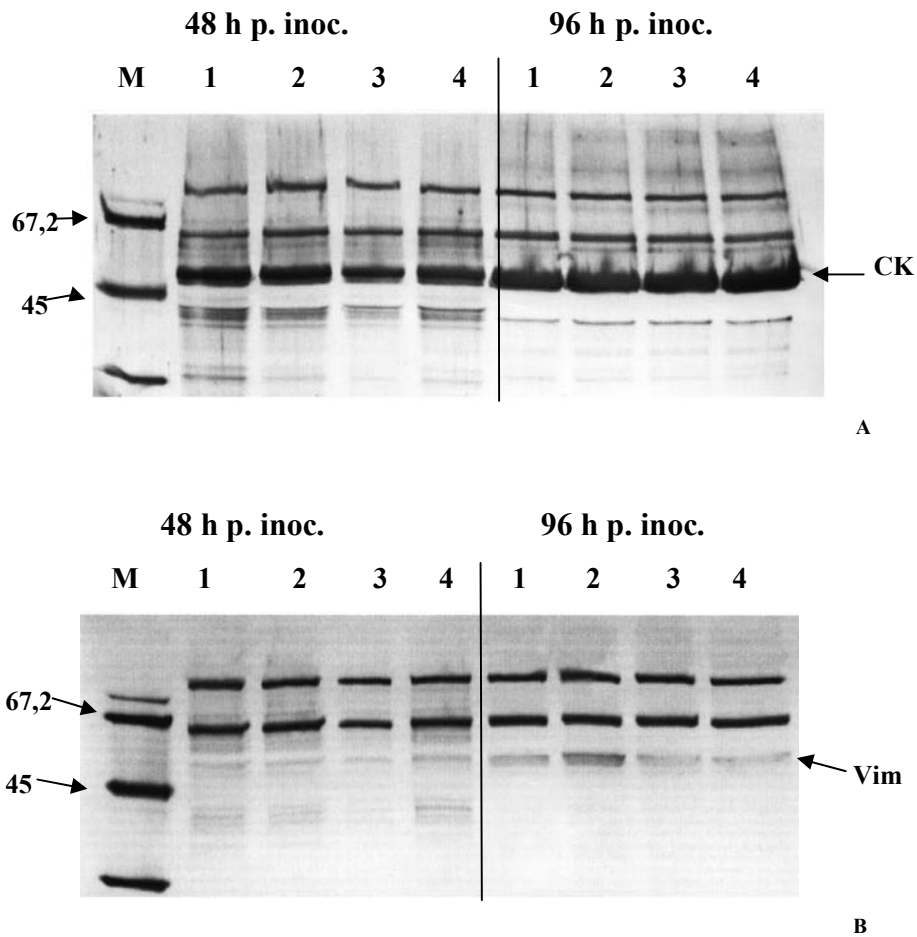


Abbildung 8: Untersuchung der Expression von Zytokeratin (A) und Vimentin (B) in ca. 10^6 CAM-Epithelzellen *in vitro* nach 48 und 96 h p. inoc. mittels Western blot. (1) Ham's F12 + 5F; (2) Ham's F12 + 5F + EGF; (3) Ham's F12 + 5F + 2,5% FKS; (4) Ham's F12 + 5F + 5% FKS; (M) Molekulargewichtsmarker (kDa). Die Western blots wurden mit Hilfe eines monoklonalen Anti-Pan-Zytokeratin-Antikörpers (Clone PCK-26) oder eines monoklonalen Anti-Vimentin-Antikörpers (Clone Vim-13.2) dargestellt.

3.1.5.2 Zellmorphologie

Die CAM-Epithelzellen wiesen die so genannte „Pflasterstein“-Zellmorphologie auf. Sie waren sehr dicht miteinander verbunden, das Nukleus-Zytoplasma-Verhältnis war ca. 2:1. Im Zellkern waren zwei große Zentriolen zu sehen (s. Abb. 9 E, Pfeile). Die Zellen bildeten Kolonien ab 24 h p.inoc. (s. Abb. 9 A), welche bis 48 h p. inoc. deutlich größer wurden (s. Abb. 9 B), und 72 h p. inoc., nach der Zugabe des Ca^{2+} , schloss sich der Zellrasen (s. Abb. 9 C). Nach 7 Tagen wurde der Zellrasen teilweise mehrschichtig und war noch auf der Gewebekulturschale vorhanden (s. Abb. 9 D).

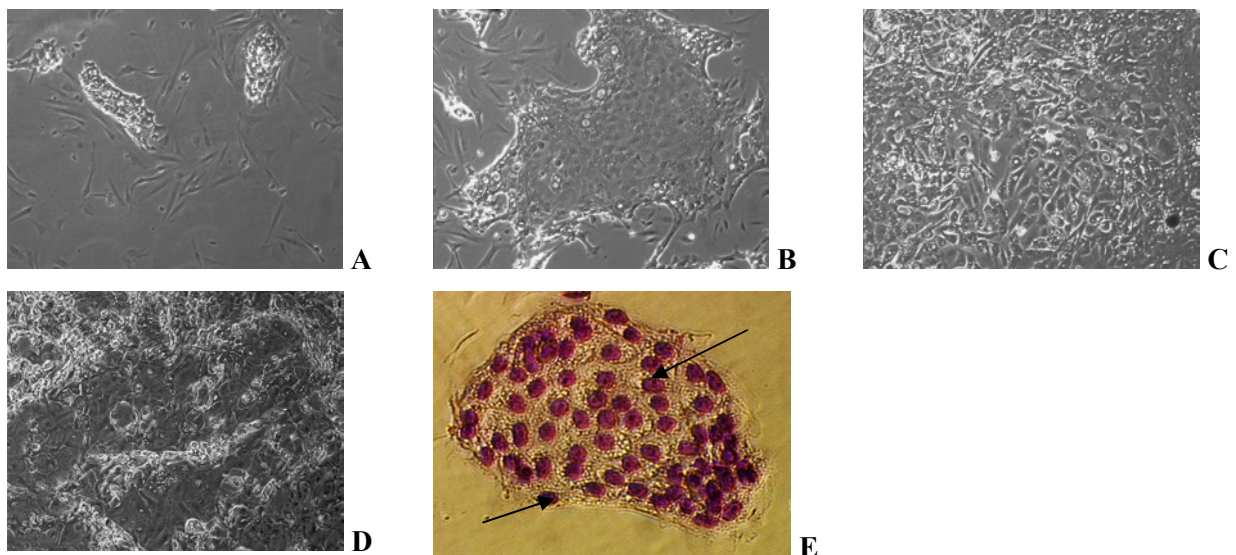


Abbildung 9: Darstellung der CAM-Epithelzellen auf der Gewebekulturschale in der Phasen-Kontrastmikroskopie. Die Zellen wurden 1 Tag (A), 2 Tage (B) im F12-Basismedium + 5F und 3 Tage (C), 7 Tage (D) im F-12-Basismedium + 1,3 mM Ca^{2+} inkubiert. (E) Die Kolonie von CAM-Epithelzellen bei Giemsa-Färbung 48 h p. inoc.: Der Zellkern ist rot, das Zytoplasma blau gefärbt. Die Pfeile zeigen auf Zentriolen.

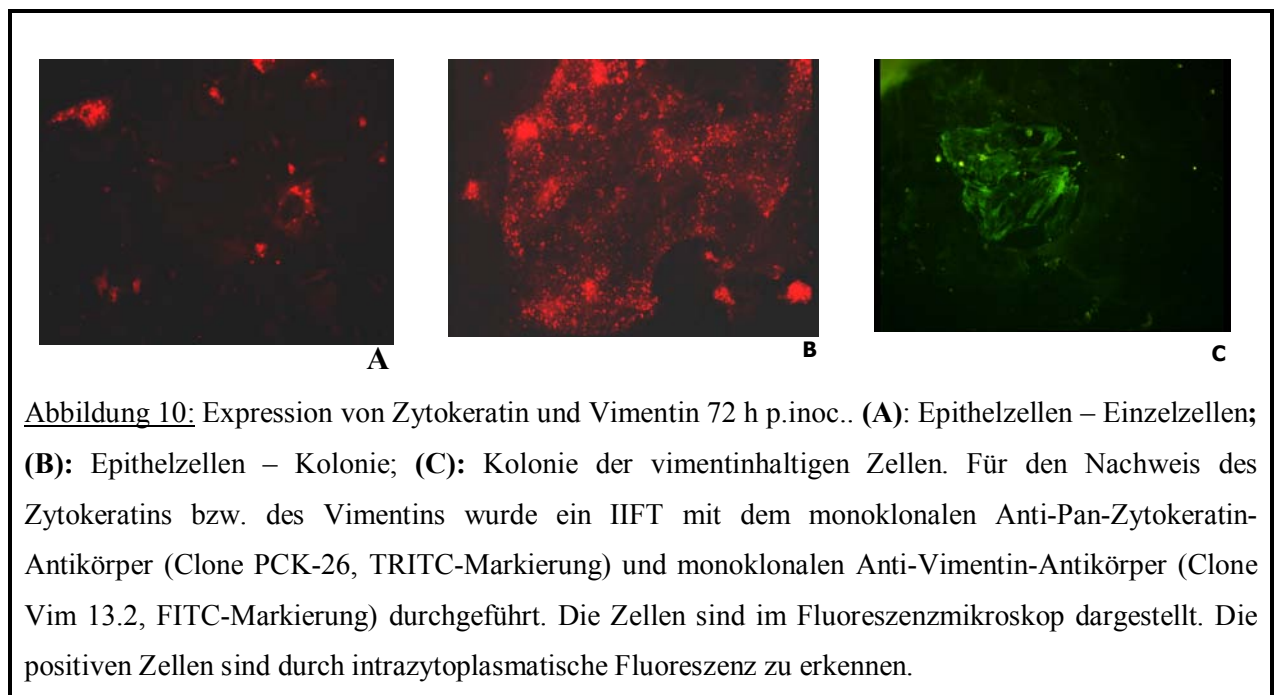
3.1.5.3 IIFT zum Nachweis von Zytokeratin und Vimentin in vitro

Die CAM-Epithelzellen wurden im F12-Basismedium + 5F inkubiert. Zur Abschätzung des Anteils epithelialer Zellen und zur Beurteilung der Kontaminationen mit Fibroblasten wurde die Expression des zytoskelettspezifischen Zytokeratins 72 h p. inoc. mittels IIFT untersucht. Die Zellen wurden mit eiskaltem Methanol fixierten Proben mit einem entsprechenden monoklonalen Antikörper inkubiert (Clone PCK-26 für den Nachweis von Zytokeratin und

Clone Vim-13.2 für den Nachweis von Vimentin). Weiterhin wurden die Proben mit FITC- oder TRITC-markiertem Anti-Maus-Antikörper behandelt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die Abbildung 16 (A, B) zeigt, dass das F12-Basismedium + 5F bzw. F12-Komplettmedium die Expression vom epithelspezifischen Marker - Zytokeratin - unterstützt, d.h. das ausgewählte Medium die Vermehrung von CAM-Epithelzellen fördert.

Ebenso wurden nach 72 Inkubationsstunden ca. 2-3 Kolonien pro Platte mit ca. 10 bis 15 vimentinhaltigen Zellen nachgewiesen (s. Abb. 10 C). Die Kolonien wurden in den Zellrasen eingeschlossen und stellten keine Beeinträchtigung der Virusanzucht dar. Die Benutzung einer Gewebekulturschale mit einem kleineren Volumen vermeidet einen Fibroblastenüberwuchs. Es zeigte sich, dass am besten die 6-Loch- oder 35 mm-Gewebekulturschalen geeignet sind.



3.1.6 HEL-Kultur

Bei der Gewinnung und Züchtung von primären Hepatozyten wurde auf zahlreiche Veröffentlichungen zurückgegriffen.

Die Lebern 10 Tage bebrüteter Hühnerembryonen wurden entnommen und in PBS gewaschen. Die unzerkleinerte Leber wurde enzymatisch behandelt. Für die Isolierung der Hepatozyten wurden die Lebern 30 min in der Trypsin-EDTA-Lösung behandelt (1:100 in GKN-2). Die Zellen wurden nach dem Zentrifugieren (3 min, 1000 x g) von dem Überstand getrennt, mit einem eiskalten Medium einmal gewaschen, nochmals zentrifugiert und im Wachstumsmedium resuspendiert. Die Kultivierung der embryonalen Hepatozyten fand im

Williams' Medium E statt (WILLIAMS u. GUNN 1974). Das Medium wurde mit 5% FKS, 6mM Glutamin, 10mM Hepes, 10N NaOH 30µl/100ml und Penicillin-Streptomycin 1:100 angereichert.

Nach der Vitalitätskontrolle und der Zellzahlbestimmung wurden die vorhandenen Zellsuspensionen mit dem entsprechenden Medium bis zu einer Endkonzentration von 4×10^6 Zellen/ml verdünnt. Die Zellen wurden in den gewünschten Gewebekulturflaschen bei 38°C in einem 5% CO₂-begasten Brutschrank 2 Tage kultiviert. Das Medium wurde nach 48 h gewechselt. Als Erhaltungsmedium für die embryonalen Hepatozyten wurde FKS-freies William's Medium E mit Glutamin 6mM und Penicillin-Streptomycin 1:100 benutzt. Da die Zellkultur unter diesen Konditionen vorwiegend aus Hepatozyten bestand (s. Abb. 11), wurde auf ihre vollständige Untersuchung verzichtet.

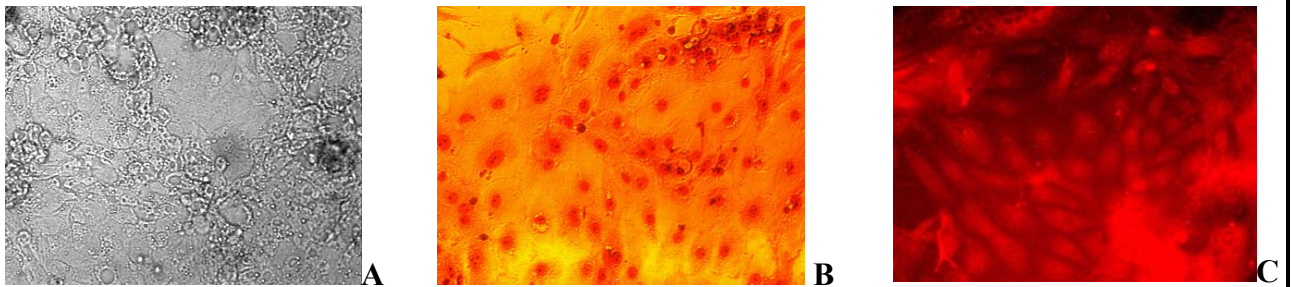


Abbildung 11: Embryonale Leber-Zellen, 72 h p. inoc. (A) Phasen - Kontrastmikroskopie des Zellrasens; (B) Morphologie der HEL-Zellen (Giemsa-Färbung); (C) Nachweis des Zytokeratins in den HEL-Zellen. Die Zellen wurden mit dem Pan-Anti-Zytokeratin-Antikörper (Clone PCK-26) inkubiert und nach der TRITC-Markierung im Fluoreszenzmikroskop dargestellt.

3.1.7 Fazit 1

Die CAM-Epithelzellen sind *in vitro* sehr schwer anzüchtbar. Deswegen war es erforderlich, im Rahmen dieser Arbeit die geeigneten Bedingungen für die Kultivierung von CAM-Epithelzellen zu ermitteln. Auf Grund der oben beschriebenen Ergebnisse werden folgende Kulturbedingungen als optimal erachtet:

- Eine Vorbehandlung mit Kollagenase-Hyaluronidase-Gemisch und danach eine fraktionierte enzymatische Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung sind für die Gewinnung der CAM-Epithelzellen empfehlenswert.
- Bei Aussaat der Zellen ist eine hohe Zelldichte notwendig, um den Fibroblastenüberwuchs zu unterdrücken. In dieser Arbeit wurde eine Zelldichte von 4×10^6 Zellen/ml benutzt.

- Die Ergänzung des serumfreien Ham's F12-Medium mit Na-Pyruvat 1:1000, 6 mM Glutamin, Penicillin-Streptomycin 1:100, 10 mM Hepes, 10N NaOH 30 µl/100ml, 5 µg/ml Insulin, ITS 1:100, synthetischem Serumersatz 1:1000 und 5 nM Dexamethason liefert die besten Ergebnisse. Es reicht ein Mediumwechsel nach 48 h mit Ham's F12-Basismedium mit einem erhöhten Ca^{2+} -Gehalt von 1,3 mM.
- Der Wachstumspeak ist zwischen dem 3. und 4. Tag zu beobachten. Es handelt sich um eine „short-term-Kultur“. Die PDT beträgt ca. 16 h, die Generationszahl ca. 6 Generationen in den ersten 4 Tagen.
- Die Zellkultur ist ca. 7 Tage lebensfähig.

3.2 Generierung infektiöser Nachkommen in embryonierten Hühnereiern

Die für diesen Teil der Arbeit relevante Zielstellung war, die Stämme Cu-1, BD-3/99wt, BD-3/99mc und BD-3/99tc auf ihre Vermehrbarkeit im embryonierten Ei zu untersuchen um die Frage zu beantworten, in welchen embryonalen Zellen sich das Virus am besten repliziert und welche Titer diese Viren dort erreichen. Dadurch sollte geklärt werden, ob primäre CAM-Epithelzellen und embryonale Leber-Zellen als geeignete Zellen für die *in vitro*-Züchtung der hv-IBDV-Stämme in Frage kommen.

Da der cv-Stamm Cu-1, der hv-Stamm BD-3/99wt, der molekular klonierte Stamm BD-3/99mc und der zellkulturadaptierte Stamm BD-3/99tc in die Forschungsarbeit aufgenommen wurden, war es auch interessant, gleichzeitig deren biologische Eigenschaften *in ovo* zu prüfen und zu vergleichen.

Die Viren wurden in den der Tabelle 4 genannten Mengen auf die CAM gegeben. Die Eier wurden bei 37°C in einem getrennten Inkubator je nach Zielstellung 3 bis 6 Tage bebrütet. Danach wurden die Eier 2 h bei 0°C abgekühlt und weiter untersucht.

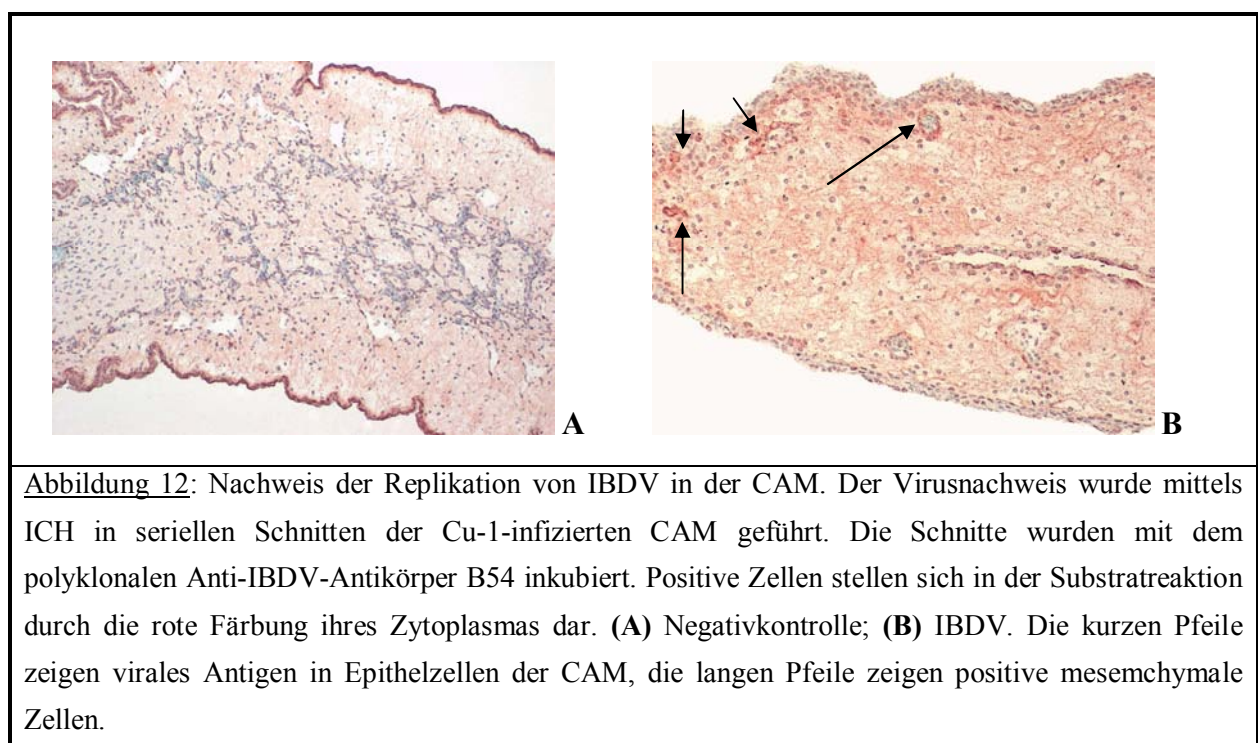
Tabelle 4: Art und Dosis des infektiösen Materials

| | Cu-1 | BD-3/99tc | BD-3/99wt | BD-3/99mc |
|----------------------|---|---|---------------------------------------|--------------------|
| Infektiöses Material | Zellkulturüberstand, ca. $1,7 \times 10^7$ PBE/ml | Zellkulturüberstand, ca. 6×10^3 PBE/ml | 10% Embryohomogenat, 2. Passage im Ei | 20% Bursahomogenat |
| Dosis pro Ei | 200 µl / 10^3 PBE/ml | 200µl / 10^3 PBE/ml | 200 µl unverdünnt | 100µl unverdünnt |

3.2.1 Nachweis viraler Antigene in der CAM

Eine Grundlage dieser Arbeit war die Vermutung, dass sich Epithel ektodermalen Ursprungs *in vitro* wie *in ovo* mit den hv-IBDV-Stämmen infizieren lässt. Daher war es interessant, genauer zu erfahren, welche Art Zellen sich zuerst infizieren lassen. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Eier mit dem Stamm Cu-1 infiziert (s. Tab. 4), und nach 3 Tagen waren die Embryonen entweder abgestorben oder durch die Abkühlung abgetötet. Die CAM wurde geerntet und mittels IHC untersucht (s. Abschnitt 2.2.13.4). Als Negativkontrolle wurde die gleiche Menge an PBS auf die CAM gegeben. Die Schnitte wurden mit dem polyklonalen Anti-IBDV-Antikörper B54 inkubiert. Positive Zellen stellten sich in der Substratreaktion durch die rote Färbung ihres Zytoplasmas dar.

Bei der IHC-Untersuchung der CAM des Cu-1-infizierten Eies auf virale Antigene wurde eine positive Reaktion nach 3 Tagen in Form einer roten Färbung des Zytoplasmas beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass sich das virale Antigen in den Epithelzellen nachweisen lässt (s. Abb. 12 B, kurze Pfeile). Ebenso lassen sich die Mesenchymzellen infizieren und es wurden antigen-positive Zellen im Bereich rund um die Gefäße gefunden (s. Abb. 12 B, lange Pfeile). Die Ansammlung der antigenpositiven Zellen rund um Gefäße spricht dafür, dass die Blutbahn eine wesentliche Rolle bei der Virusverbreitung im Ei spielt. Das Virus wird vermutlich mit dem O₂-reichen Blut durch die Allantoisvenen direkt in die linke Lebervene geleitet, wo die Virusvermehrung stattfindet.



3.2.2 Nachweise des Virusantigens im infektiösen Material

3.2.2.1 *Pathologisch-anatomische Veränderungen der Embryonen*

Die nach einer Inkubation von 3 bis 6 Tagen abgestorbenen Embryonen wurden obduziert. Folgende pathologisch-anatomische Veränderungen wurden festgestellt: Die Cu-1-, BD-3/99wt- und BD-3/99mc-infizierten Embryonen waren missgebildet: der Kopfbereich war ödematös (s. Abb. 13 B, C, D, kurze Pfeile), eine Befiederungsstörung war deutlich ausgeprägt und petechiale Blutungen waren zu sehen. Die Leber war entweder nekrotisch, brüchig, gelb (s. Abb. 13 B, C, lange Pfeile) oder vergrößert mit nekrotischen Pünktchen (s. Abb. 13 D, E, lange Pfeile). Die Bursa Fabricii und die Chorioallantoismembranen waren ohne sichtbare Veränderungen.

Besonders interessant waren die Befunde bei den Embryonen, die mit dem Stamm BD-3/99tc infiziert worden waren. Der Stamm ist mittels reverser Genetik zellkulturadaptiert und weist eine schwache Virulenz für Hühner auf (RAUE et al. 2004). In den abgestorbenen Embryonen der ersten Passage waren die pathologisch-anatomischen Veränderungen nicht so deutlich ausgeprägt wie bei der Infizierung mit den virulenten Stämmen Cu-1, BD-3/99wt oder BD-3/99mc. Die Leber war vergrößert mit nekrotischen Pünktchen am Rand (s. Abb. 13 E, lange Pfeile). Nach den vier Inkubationstagen der zweiten Passage waren die Embryonen noch lebend. Der allgemeine Befund war der negativen Kontrolle sehr ähnlich (s. Abb. 13 F). Die Leber war glänzend rot, ohne besonderen Befund. Virusantigen war jedoch mittels IHC (s. Abb. 14 E) und RT-PCR (s. Abb. 17, Bahn 2) nachgewiesen.

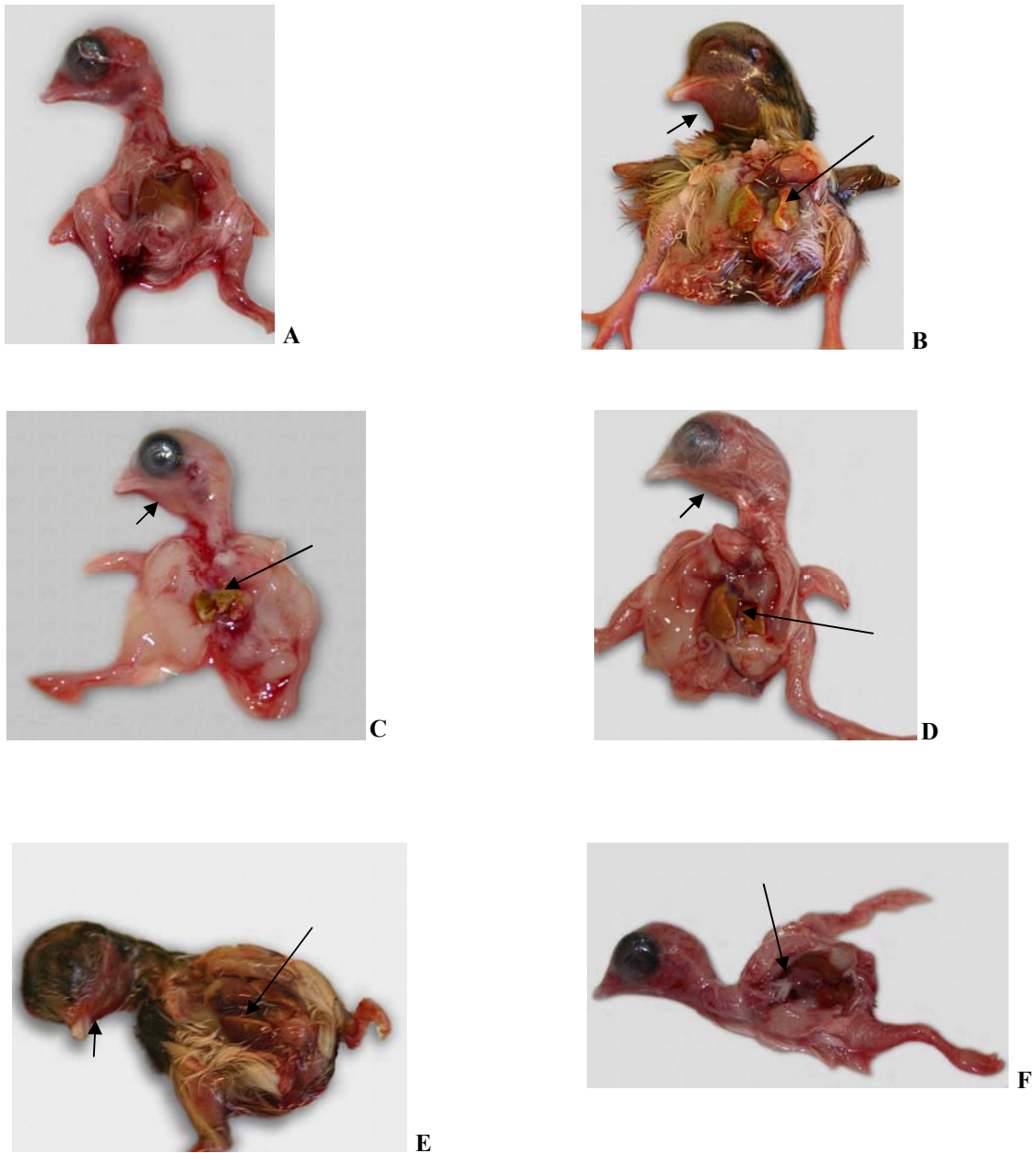


Abbildung 13: Pathologisch-anatomische Veränderungen der Embryonen 96 h nach Infektion.

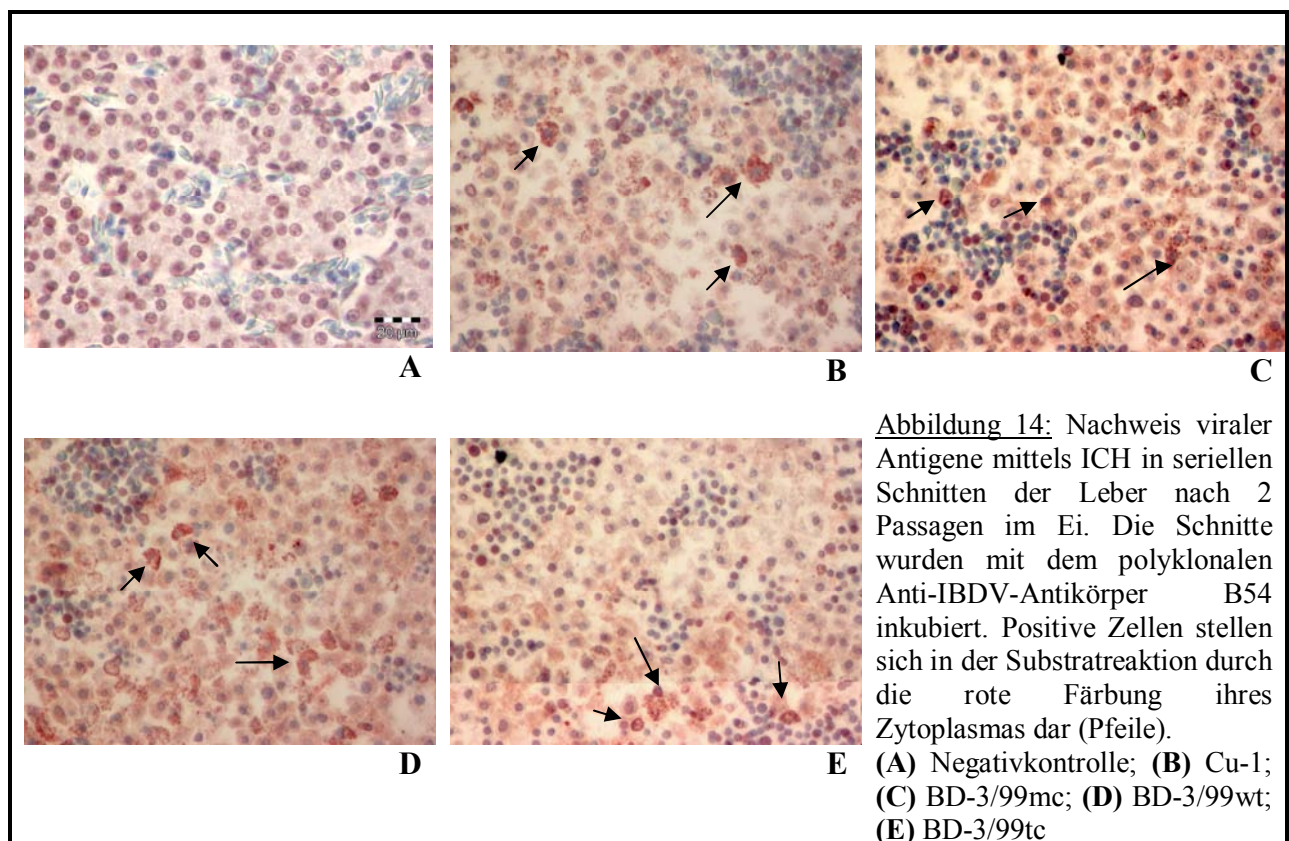
(A) Negativkontrolle; (B) Cu-1; (C) BD-3/99mc; (D) BD-3/99wt; (E) BD-3/99tc 1. Passage; (F) BD-3/99tc 2. Passage. Die kurzen Pfeile zeigen Ödeme im Kopfbereich; die langen Pfeile zeigen die Veränderungen der Leber.

3.2.2.2 *Nachweis viraler Antigene mittels Immunhistochemie*

Um zunächst einen Einblick in die Vermehrung der einzelnen Virusstämme *in vivo* zu erhalten, wurden die Lebern mit ausgeprägten pathologisch-anatomischen Veränderungen (s. Abb. 13) auf das Vorhandensein viraler Antigene in den Zellen mittels immunhistologischem Nachweisverfahren (s. Abschnitt 2.2.13.4) untersucht. Die Gewebeschnitte wurden mit dem polyklonalen Anti-IBDV-Antikörper B54 inkubiert.

Die Lebern der mit den virulenten Stämmen Cu-1, BD-3/99wt und BD-3/99mc infizierten Embryonen zeigten eine positive Reaktion in Form einer roten Färbung des zytoplasmatischen Antigens (s. Abb. 14 B, C, D).

Obwohl der attenuierte Stamm BD-3/99tc im Vergleich zu den virulenten Stämmen nicht so deutliche pathologisch-anatomische Veränderungen hervorruft (s. Abschnitt 3.2.2.1), wurde mittels IHC das IBD-Antigen nachgewiesen (s. Abb. 14 E). Bei der visuellen Kontrolle der Präparate war zu bemerken, dass die Zahl der betroffenen Hepatozyten in den drei Untersuchungsfeldern des BD-3/99tc-Präparates wesentlich geringer war als bei der Infizierung mit cv-IBDV oder hv-IBDV.



3.2.2.3 *Titerbestimmung des infektiösen Materials*

In den im folgenden Abschnitt dargestellten Versuchen sollte die Infektiosität des Virus in der CAM und in der embryonalen Leber untersucht werden. Die Menge an infektiösem Virus in der CAM und in der Leber sollte austitriert werden, um einen Hinweis dafür zu erhalten, in welchem Ausmass in diesen Organen die Virusreplikation abläuft.

Die embryonalen CAM und die Lebern wurden 3 Tage nach Infektion mit den Stämmen Cu-1 und BD-3/99tc getrennt gewonnen, homogenisiert sowie dreimal gefroren und wieder aufgetaut. Die Infektiosität der Viren wurde im Plaquetest bestimmt. Die Titer sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Vergleich des Virusgehaltes in PBE/ml in CAM und embryonalen Lebern 3 Tagen p.i.

| | CAM | Leber |
|-----------------------|--------------------|--------------------|
| BD-3/99tc, 1. Passage | $2,5 \times 10^2$ | $1,25 \times 10^4$ |
| BD-3/99tc, 2. Passage | $2,5 \times 10^1$ | $1,0 \times 10^2$ |
| Cu-1, 1. Passage | $5,0 \times 10^3$ | $1,75 \times 10^5$ |
| Cu-1, 2. Passage | $1,75 \times 10^5$ | $2,75 \times 10^7$ |

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, dass sowohl die CAM als auch die Leber die Virusreplikation unterstützen. Die Leber weist einen höheren Virusgehalt als die CAM auf; der Unterschied beträgt ca. 2 lg. Weiterhin wurden für die Herstellung des Saatvirus nur die CAM und die Leber entnommen und dadurch eine höher konzentrierte Virussuspension gewonnen. Die beiden nicht zellkulturadaptierten hv-BD-3/99-Stämme zeigen keinen ermittelbaren Titer im Plaquetest.

Da die hv-IBDV-Stämme nicht in der HEF-Kultur vermehrungsfähig sind, wurde die $EID_{50}/0,1\text{ml}$ mitermittelt, um einen Überblick über die Infektiosität des Virus nach zwei Eipassagen zu gewinnen. In Tabelle 6 werden die ermittelten Titer des CAM-Leber-Homogenats der untersuchten IBDV-Stämme, die weiterhin als Saatvirus für die weiteren Versuche benutzt wurden, dargestellt.

Die $EID_{50}/0,1\text{ml}$ spricht dafür, dass die Stämme Cu-1, BD-3/99wt und BD-3/99mc eine hohe Infektiosität besitzen, die mit den Passagen steigt. Der Stamm BD-3/99wt zeigt einen höheren Titer als die Stämme Cu-1 und BD-3/99mc. Das Virus war im Jahre 1989 aus einem

IBD-Ausbruch in Bangladesch isoliert worden, und damit konnte die höhere Infektiosität des Virus erklärt werden.

Dagegen zeigt BD-3/99mc, ein molekular klonierter parentaler Stamm, einen niedrigeren Titer als der Ausgangsstamm BD-3/99wt. Der Unterschied liegt in einem Bereich von 0,6 bis 0,75 EID₅₀/0,1ml (s. Tab. 6). Die verminderte Replikationsfähigkeit der molekular klonierten Viren war bereits bei OBERLÄNDER (2004) beschrieben worden.

Der Cu-1-Stamm ist ein zellkulturadaptierter Stamm, der noch Virulenz besitzt. Das Virus zeigt einen steigenden Virustiter in PBE/ml, und die Ermittlung der EID₅₀/0,1ml zeigt, dass die Replikationsfähigkeit des Virus *in ovo* vergleichbar ist mit der des Stammes BD-3/99mc (s. Tab. 6).

Dagegen zeigt der Stamm BD-3/99tc im Vergleich zum Stamm Cu-1 einen deutlich niedrigeren Titer im Plaquetest, der nach zwei Ei-Passagen noch niedriger wird. Die Infektiosität des Zellkulturüberstandes, der als Ausgangsmaterial benutzt wurde, war 3×10^3 PBE/ml und $10^{1,53}$ EID₅₀/0,1ml. Diese Ergebnisse zeigen nochmals, dass die Zellkulturadaptation der hv-IBDV-Stämme mit deren Attenuierung und dadurch mit einer abnehmenden Replikationsfähigkeit verbunden ist.

Tabelle 6: Bestimmung der PBE/ml und EID₅₀/0,1ml der Aussaatviren nach zwei Eipassagen

| Probe | Titer | |
|-----------------------|--------------------|--------------------------|
| | PBE/ml | EID ₅₀ /0,1ml |
| BD-3/99tc, 1. Passage | $2,75 \times 10^3$ | nicht ermittelbar |
| BD-3/99tc, 2. Passage | $7,5 \times 10^1$ | nicht ermittelbar |
| BD-3/99mc, 1. Passage | nicht ermittelbar | 10^4 |
| BD-3/99mc, 2. Passage | nicht ermittelbar | 10^5 |
| BD-3/99wt, 1. Passage | nicht ermittelbar | $10^{4,75}$ |
| BD-3/99wt, 2. Passage | nicht ermittelbar | $10^{5,6}$ |
| Cu-1, 1. Passage | $1,5 \times 10^5$ | $10^{3,85}$ |
| Cu-1, 2. Passage | $1,25 \times 10^7$ | $10^{4,5}$ |

3.2.3 Darstellung der viralen Strukturproteine im Western blot

Da der Plaquetest und die Ermittlung der $EID_{50}/0,1\text{ml}$ die Aussage über die Menge infektiöser Viren, nicht aber über die Menge der gebildeten viralen Antigene liefern, wurde entschieden, die Western blot-Analyse durchzuführen, um die Antigenmengen in verschiedenen Vermehrungssystemen vergleichen zu können.

Die Expression viraler Proteine in den Eiern wurde im Western blot untersucht (s. Abschnitt 2.2.13.2). Aus den Eiern wurden 3 Tage nach der Infektion die Leber und die CAM gewonnen, homogenisiert sowie dreimal gefroren und wieder aufgetaut. Danach wurde ein Western blot durchgeführt und dieser mit Hilfe des polyklonalen Anti-IBDV-Antikörpers B54 entwickelt.

Die cv-IBDV- und hv-IBDV-Stämme zeigten eine vergleichbare Menge des Virusantigens nach zwei Passagen im Ei (s. Abb. 15, Bahnen 2, 5, 6). Die Proteinbanden in Höhe des VP2 stellen sich sehr schwach dar. In Höhe des VP3 lassen sich keine Proteinbanden nachweisen. Da das Ausgangsvirus BD-3/99wt als Ei-Isolat in die Arbeit aufgenommen wurde, wurde es auch im Western blot getestet (s. Abb. 16 A, Bahn 2). Im Vergleich zu den Proteinmengen des BD-3/99mc aus der Bursa Fabricii (s. Abb. 16 B, Bahnen 1 und 2) ist die Menge des Virus-Proteins im Ei geringer und entspricht vermutlich einer 1:2000-Verdünnung des Bursa-Isolats.

Im Bursahomogenat sind die VP2-Proteinbanden am besten zu sehen (s. Abb. 16 B). Das hängt vermutlich damit zusammen, dass sich das Virus in der Bursa Fabricii am besten repliziert. Bei der Verdünnung 1:100 des 20%-igen Bursahomogenats sind die VP2-Proteinbanden zu sehen. Es bestätigt sich ein hoher Gehalt des Virusantigens in der BF. Das VP3-Protein ist schwach ausgeprägt (s. Abb. 16 B, Bahn 1).

Der BD-3/99tc-Stamm zeigt ein anderes Muster. Der Stamm gilt als attenuiert und nach der ersten Passage zeigt er das gleiche Muster wie die anderen Stämme (s. Abb. 15, Bahn 3), aber nach der zweiten Passage sind keine Proteinbanden zu sehen (s. Abb. 15, Bahn 4). Das spricht für eine geringere Menge des BD-3/99tc-Virusantigens. Eine geringere Zahl antigen-positiver Zellen war bereits im IHC-Befund zu sehen (s. Abb. 14 E).

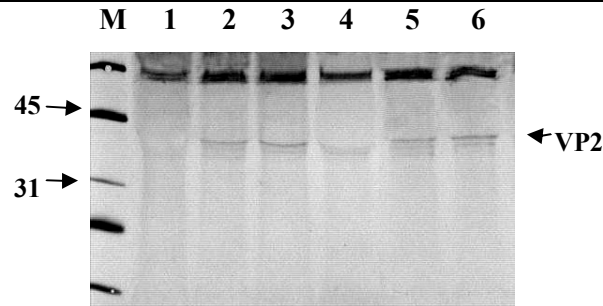


Abbildung 15: Nachweis IBDV-spezifischer Proteine 3 Tage p.i. mittels Western blot. **(M)** Molekulargewichtsmarker (kDa); **(1)** Negativkontrolle; **(2)** Cu-1 2. Passage; **(3)** BD-3/99tc 1. Passage; **(4)** BD-3/99tc 2. Passage; **(5)** BD-3/99mc 2. Passage; **(6)** BD-3/99wt 4. Passage. Der Western blot wurde mit Hilfe des polyklonalen Anti-IBDV-Antikörpers B54 entwickelt.

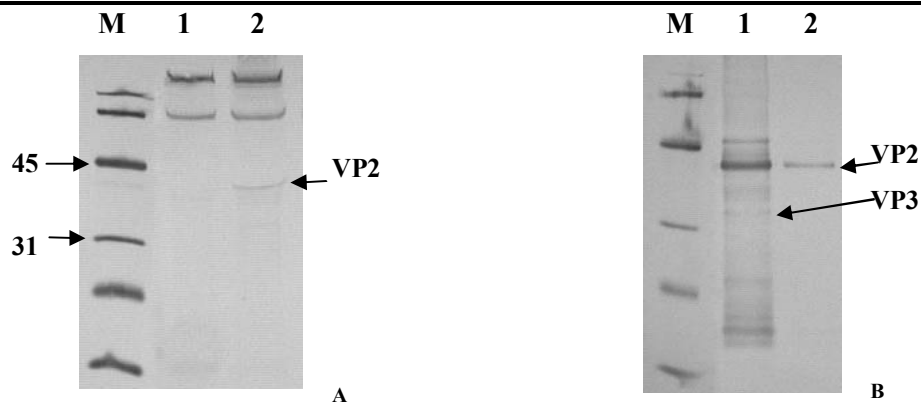


Abbildung 16: **(A)** Nachweis des Stammes BD-3/99wt nach der 2. Passage im embryonierten Hühnerei mittels Western blot. **(Bahn 1)** Negativkontrolle; **(Bahn 2)** BD-3/99wt; **(B)** Nachweis des Stammes BD-3/99mc im Bursahomogenat mittels Western blot. **(Bahn 1)** Verdünnung 1:10 der 20%-igen Bursasuspension; **(Bahn 2)** Verdünnung 1:100 der 20%-igen Bursasuspension. Die Western blots wurden mit Hilfe des polyklonalen Anti-IBDV-Antikörpers B54 entwickelt; **(M)** Molekulargewichtsmarker (kDa).

3.2.4 Bestimmung des Genoms mittels RT-PCR und RE-Analyse des PCR-Produktes nach den Eipassagen

Die Charakterisierung der viralen Nachkommen erfolgte mittels der RT-PCR und anschließender REA. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus dem CAM-Leber-Homogenat mit Hilfe des RNeasy Mini Kits® (Qiagen, Hilden) isoliert. Unter Verwendung des Primerpaares VP2R/VP2F (s. Abschnitt 2.1.8) und dem One Step RT-PCR Kit® (Qiagen, Hilden) wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die erhaltenen Produkte mit einer Größe von 723 bp schlossen den für die variable Region des VP2 kodierenden Genomabschnitt ein (s. Abb. 17 A).

Für die Beantwortung weiterer Fragen wurden die erhaltenen RT-PCR-Produkte gereinigt (s. Abschnitt 2.2.10) und mit Hilfe des TA-cloning Kit® (Invitrogen) in einen Vektor einkloniert (s. Abschnitt 2.2.11). Für die analytische REA mit einem Gesamtvolumen von 15 µl werden 5 µl DNA-Lösung aus einer Plasmidpräparation mit einem Enzym und dem entsprechenden Puffergemisch für 2 h bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.

Die Proben wurden mit den Restriktionsendonukleasen *SacI*, *BspMI*, *NaeI* inkubiert. Das Enzym *SacI* besitzt nur bei den cv-IBDV-Stämmen eine Schnittstelle (bei nt 868), wodurch die DNA in zwei Fragmente von 317 bp und 406 bp gespalten wurde (s. Abb. 17 B, Bahn 1). Durch den Verdau mit dem Enzym *BspMI* entstanden nur bei den Proben des aus dem CAM-Leber-Homogenat isolierten BD-3/99 zwei Fragmente mit einer Größe von 239 und 484 bp (s. Abb. 17 C, Bahnen 2, 3, 4) (ZIERENBERG et al. 2001). Zur Unterscheidung zwischen dem zellkulturadaptierten BD-3/99tc und hv-IBDV wurden die RT-PCR-Produkte parallel mit dem *NaeI* inkubiert (s. Abb. 17 D). Die hv-IBDV-Stämme BD-3/99wt und BD-3/99mc wurden durch das Enzym *NaeI* gespalten (s. Abb. 17 D, Bahnen 3, 4), dagegen spaltete das Enzym *NaeI* das Isolat BD-3/99tc nicht (s. Abb. 17 D, Bahn 2) (RAUE et al. 2004).

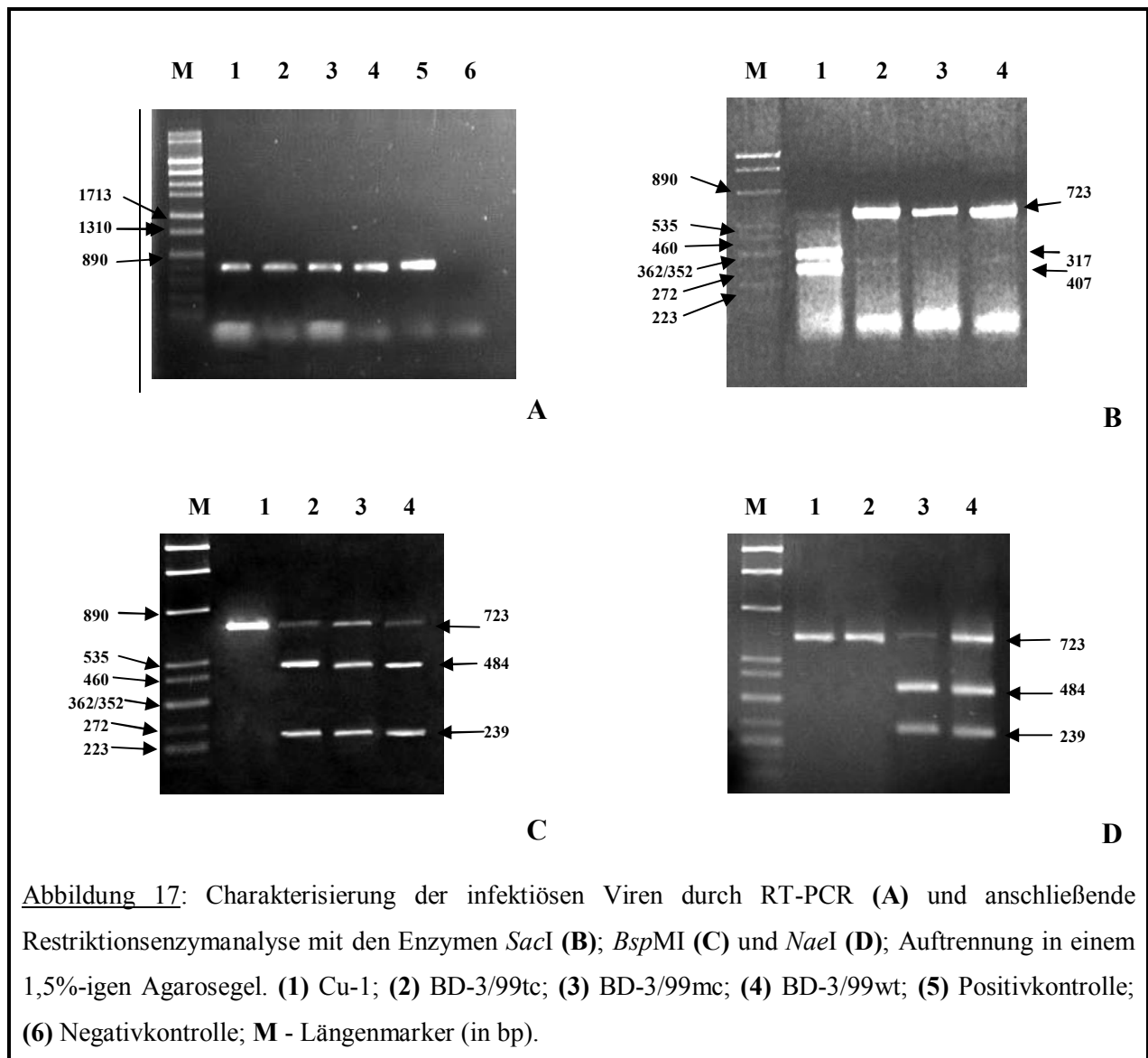


Abbildung 17: Charakterisierung der infektiösen Viren durch RT-PCR (A) und anschließende Restriktionsenzymanalyse mit den Enzymen *SacI* (B); *BspMI* (C) und *NaeI* (D); Auftrennung in einem 1,5%-igen Agarosegel. (1) Cu-1; (2) BD-3/99tc; (3) BD-3/99mc; (4) BD-3/99wt; (5) Positivkontrolle; (6) Negativkontrolle; M - Längenmarker (in bp).

3.2.5 Fazit 2

- Sowohl die CAM-Epithelzellen als auch die embryonalen Hepatozyten unterstützen *in ovo* die Vermehrung des hv-IBDV und stellen damit eine Möglichkeit der *in vitro*-Vermehrung des hv-IBDV in den aus diesen Organen hergestellten Zellkultursystemen dar.
- Die Stämme Cu-1, BD-3/99wt und BD-3/99mc vermehren sich in den Hühnerembryonen mit den für das IBDV üblichen makroskopischen Läsionen der Embryonen und zeigen einen hohen Titer in EID₅₀/0,1ml.
- Die Infektiosität des zellkulturadaptierten Stammes BD-3/99tc sinkt mit den Eipassagen und das Virus lässt sich nur mittels ICH und RT-PCR nachweisen.

- Die Expression viraler Proteine in embryonalen Eiern ist wesentlich geringer als in der Bursa. Die Restriktionsenzymanalyse des Genoms bestätigt, dass die Nachkommen das gleiche Genom haben wie die Elternviren.

3.3 Voruntersuchung der CAM-Epithelzellen und der HEL-Zellen zur Feststellung der Replikation von IBDV in vitro (Stämme Cu-1, BD-3/99tc)

3.3.1 Nachweis des zellgebundenen Virus

Vor den Untersuchungen auf die Vermehrung von hv-IBDV-Stämmen in der etablierten CAM-Zellkultur war es wichtig, die Eignung dieser Zellkultur für die allgemeinen virologischen Untersuchungen festzustellen. Deshalb sollte bestimmt werden, ob die CAM-Epithelzellen die Vermehrung der zellkulturadaptierten Stämme Cu-1 und BD-3/99tc unterstützen, und wie die Kinetik der Vermehrung abläuft. Da die Vermehrung des hv-IBDV auch in der embryonalen Leber stattfindet (s. Abschnitt 3.2.2), wurde auch die primäre Zellkultur aus der embryonalen Leber (HEL-Zellen) parallel auf die Fähigkeit zur Virusvermehrung untersucht. Die HEF-Zellen, CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen wurden, wie im Abschnitt 2.2.1 beschrieben, gewonnen und kultiviert.

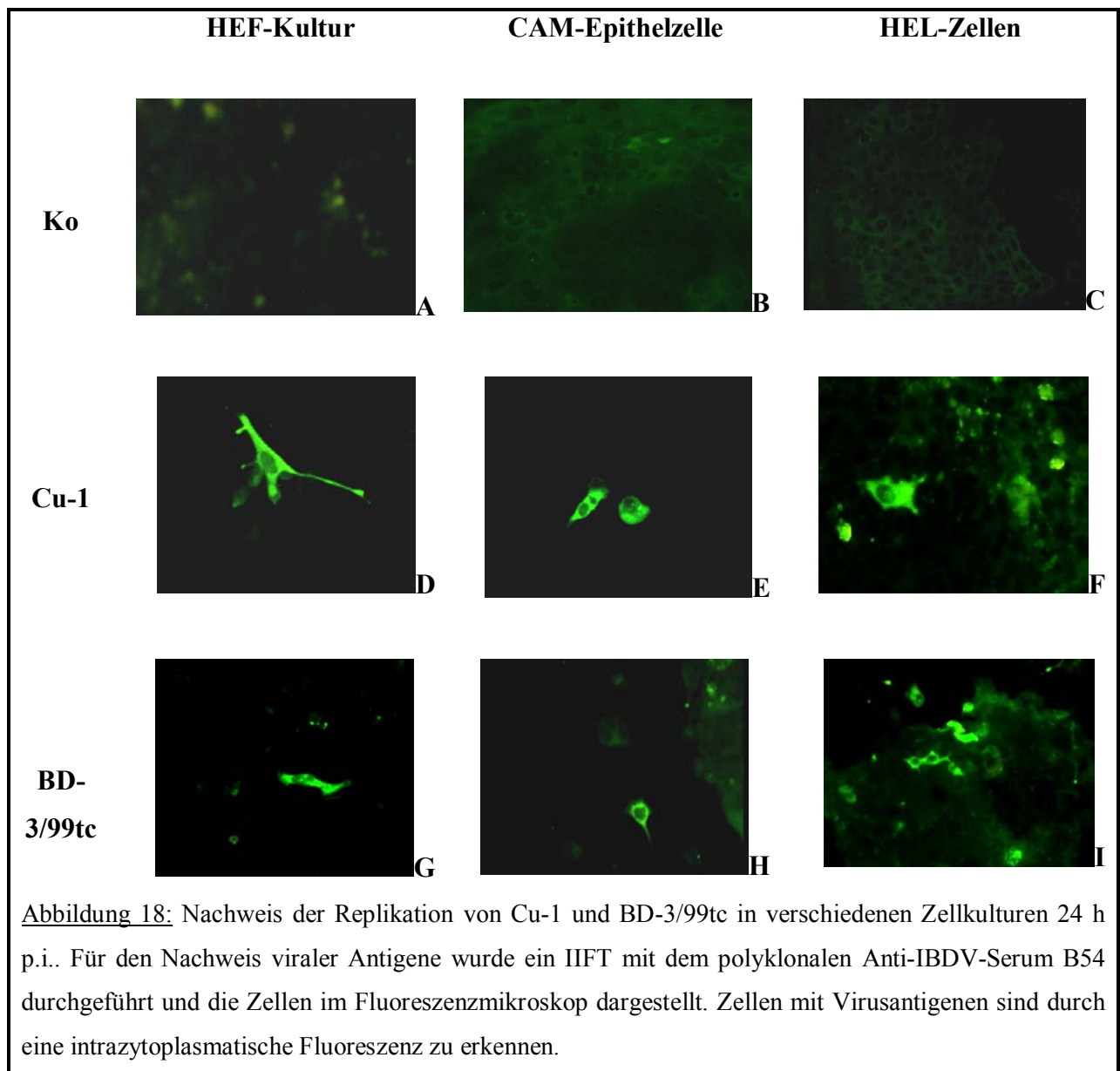
Kulturen von HEF wurden nach 24 h, CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen nach 48 h mit Cu-1 und BD-3/99tc mit einer MOI von 0,05 infiziert. Da die Vermehrung des Cu-1-Stammes in der HEF-Kultur sehr rasch vor sich geht, wurde eine niedrige MOI ausgewählt. Wegen der niedrigen MOI und der erhöhten Empfindlichkeit der CAM-Epithelzellen wurde die einstündige Absorption bei den allen Zellkultursystemen weggelassen. Das Virus wurde im entsprechenden Erhaltungsmedium bis zur gewünschten MOI verdünnt und vorsichtig zum Zellrasen gegeben. Die infizierten Zellkulturen wurden mittels IIFT, Western blot und FACS untersucht.

3.3.1.1 Nachweis des Virusantigens mittels IIFT

Der Nachweis der Stämme Cu-1 und BD-3/99tc in den genannten Zellkulturen wurde 24 h p.i. durchgeführt. Für den Nachweis viraler Antigene wurde ein IIFT mit dem polyklonalen Anti-IBDV-Antikörper B54 durchgeführt und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop dargestellt.

Im IIFT war eine intrazytoplasmatische, granuläre Fluoreszenz 24 h p.i. in allen infizierten Kulturen zu beobachten (s. Abb. 18), welche die Anwesenheit von viralen Antigenen zeigt.

In allen Cu-1-infizierten Zellkulturen waren im Vergleich zu den BD-3/99tc-infizierten Zellkulturen mehr antigen-positive Zellen zu sehen. Beobachtungen zufolge lässt sich bemerken, dass 24 h p.i. in CAM-Epithelzellen nur einzelne Zellen positiv waren, die noch nicht in den Zellrasen eingeschlossen wurden. Die Zellen, die schon in den Zellrasen eingeschlossen wurden, lassen sich schlecht beurteilen. Die geringe Infektionsrate der CAM-Epithelzellen bestätigt sich auch in der FACS-Analyse (s. Abb. 19 E, H).



3.3.1.2 *Quantifizierung Zellassoziierter viraler Antigene mittels FACS*

Für die FACS-Analyse war es notwendig, die zwar infizierten, aber noch lebenden Zellen zu untersuchen. Nach vierundzwanzig Stunden p.i. wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und in zwei Portionen geteilt (ca. 10^7 Zellen pro Probe), und es wurden die FACS- (s. Abschnitt 2.2.14) und Western blot-Analysen (s. Abschnitt 2.2.13.2) durchgeführt.

Bei der FACS-Analyse wurden zunächst infizierte und schein-infizierte Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit dem polyklonalen Anti-IBDV-Antikörper B54 inkubiert und mit dem FITC-markierten sekundären Antikörper gefärbt. Von jeder Probe wurden 10^4 Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die emittierte Energie des Fluorochroms FITC wurde gemessen und hinsichtlich der Fluoreszenzintensität der Zellen in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt.

In der Abbildung 19 sind die Ergebnisse dieses Versuches zusammengestellt. Die Zellen mit der Fluoreszenzintensität zwischen 10^2 und 10^4 wurden als positiv bewertet. Wegen einer geringeren Zahl der Zellen, die eine positive Fluoreszenzintensität aufweisen, wurden im FACS-Histogramm nur die Zellen mit einer Fluoreszenzintensität zwischen 10^2 und 10^4 (Achse X) dargestellt. Die Achse Y zeigt die Zahl der Zellen, die eine bestimmte Fluoreszenzintensität haben.

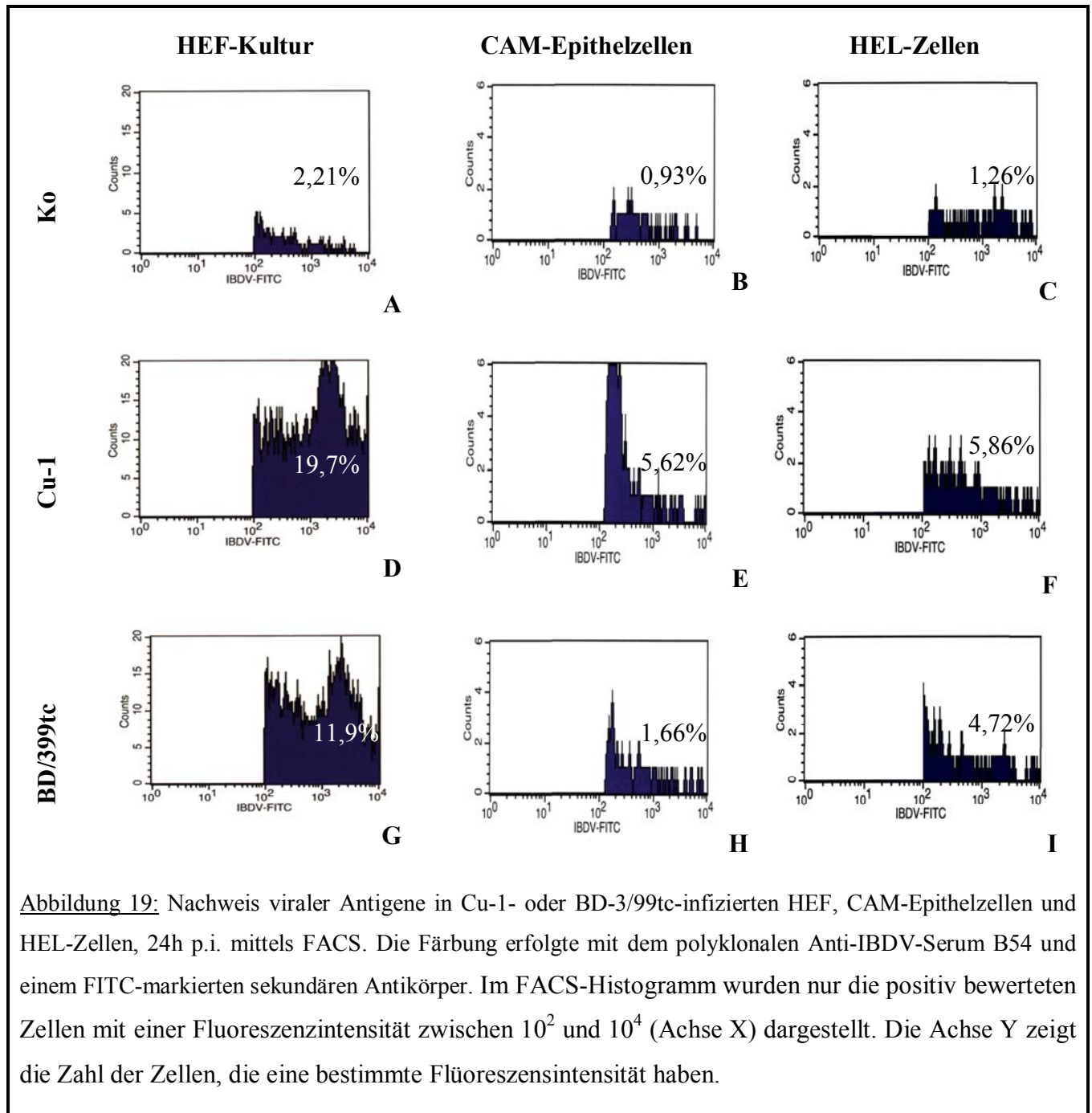
Die Fluoreszenz, die bei der FACS-Analyse der schein-infizierten Zellen entstanden war (s. Abb. 19 A, B, C), wurde als unspezifisch bewertet und aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen.

Es ist zu sehen, dass alle in dieser Arbeit untersuchten Zellkulturen die Vermehrung von Cu-1 und BD-3/99tc unterstützen. Wie erwartet, wurden deutlich mehr zellgebundene Virusantigene in den HEF-Kulturen detektiert als in den CAM- und HEL-Zellen (s. Abb. 19 D, G). Diese Ergebnisse beziehen sich auf beide untersuchten Stämme. Nach 24 h p.i. wurden bei Cu-1 19,7% und bei BD-3/99tc 11,7% antigenpositive Zellen nachgewiesen. Diese beiden Stämme sind an die HEF-Kultur adaptiert, wodurch diese Werte im erwarteten Bereich liegen.

Ein anderes Bild ist bei der Untersuchung des Antigengehalts in den CAM-Epithelzellen zu sehen (s. Abb. 19 E, H). Im Vergleich zu den HEF-Kulturen hängt die Replikationsfähigkeit vom Virus-Stamm ab. Das Cu-1-Virusantigen wiesen 5,62% der Zellen auf, aber das BD-3/99tc-Virusantigen wurde nur in 1,66% der Zellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden statistisch als nicht signifikant bewertet.

In der primären Embryoleberkultur weisen 5,86% der Zellen den Cu-1-Stamm und 4,72% den BD-3/99tc-Stamm auf (s. Abb. 19 F, I). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Virusinfektion der HEL-Zellen geringer als die der HEF-Zellen ist, aber ungefähr vergleichbar

mit der der CAM-Epithelzellen. Da die CAM-Epithelzellen und die HEL-Zellen epithelialer Herkunft sind, war dieser niedrige Antigengehalt in diesen Zellen zu erwarten.



3.3.1.3 *Analyse der viralen Proteine im Western blot*

Zum Nachweis der Viren, die infektiöse Nachkommen in den CAM-Epithelzellen und in den HEL-Zellen hervorbringen, wurden die Proben 24 h p.i. mittels Western blot untersucht. Die Membranen wurden zuerst mit dem Anti-IBDV-Antikörper B54 und danach mit dem biotinylierten Anti-Rabbit-Antikörper inkubiert. Durch die Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase und die Zugabe des Chloronaphtol-Substrats wurden die Antigen-Antikörper-Bindungen sichtbar gemacht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

Die viralen Proteine sind 24 h nach der Infektion mit Cu-1 und BD-3/99tc in den HEF-Kulturen nachweisbar (s. Abb. 20, Bahnen 2, 3, HEF).

Die Expression des VP3 ist in den CAM-Epithelzellen und in den HEL-Zellen nach der Infektion mit dem Stamm Cu-1 zu sehen (s. Abb. 20, Bahn 2, CAM, HEL). Der Nachweis von BD-3/99tc war nach 24 h in den CAM-Epithelzellen und in den HEL-Zellen im Western blot negativ (s. Abb. 20, Bahn 3, CAM, HEL), obwohl die FACS-Analyse und der indirekte IIFT sehr schwach positiv waren. Das weist darauf hin, dass die Menge des Antigens 24 h p.i. nicht ausreicht, um ein positives Signal im Western blot zu ergeben. Dass nur kleine Mengen Cu-1- und BD-3/99tc-spezifischer Proteine in den CAM-Epithelzellen und den HEL-Zellen nachweisbar waren, entspricht den Ergebnissen der FACS-Analyse (s. Abb. 19 E, H, F, I).

Andererseits sind die Stämme Cu-1- und BD-3/99tc nicht an die CAM-Epithelzellen und an die HEL-Zellen nicht adaptiert. Deshalb war es notwendig, weitere 2 Passagen durchzuführen. Dadurch sollte gezeigt werden, ob die Stämme Cu-1 und BD-3/99tc anpassungsfähig an diese Zellkulturen sind. Nach 3 Passagen war es gelungen, ein positives Signal im Western blot zu bekommen. Die Proteinbande (s. Abb. 20 B) aus den CAM-Epithelzellen und aus den HEL-Zellen blieben trotzdem im Vergleich zu den Cu-1-Banden schwächer. Die geringe Menge an Antigen, die in diesen Kulturen produziert wurde, ist weiterhin aus der Wachstumskinetik der Viren ersichtlich (s. Abb. 22).

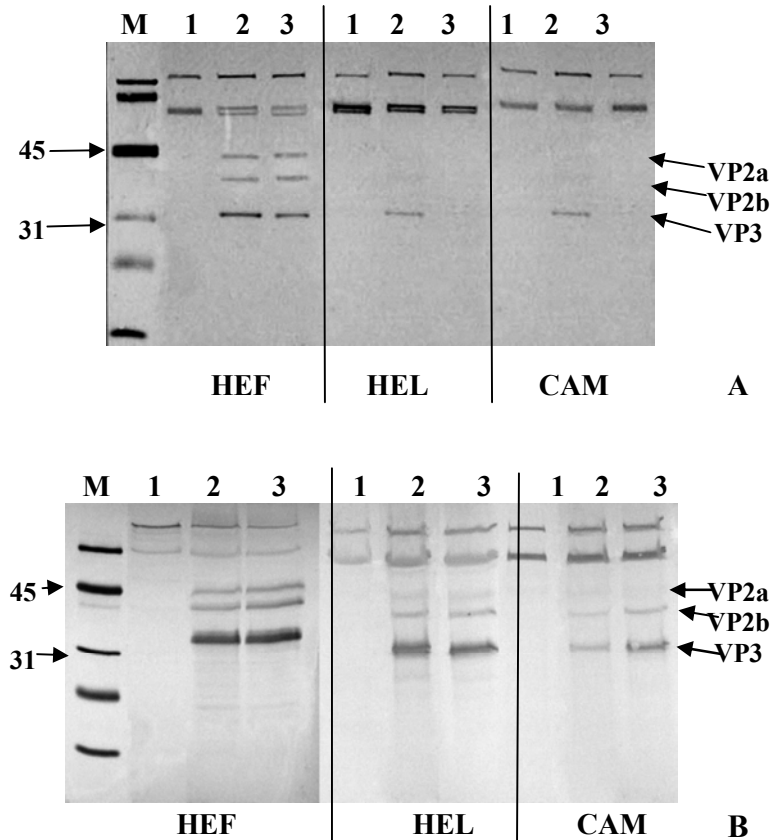


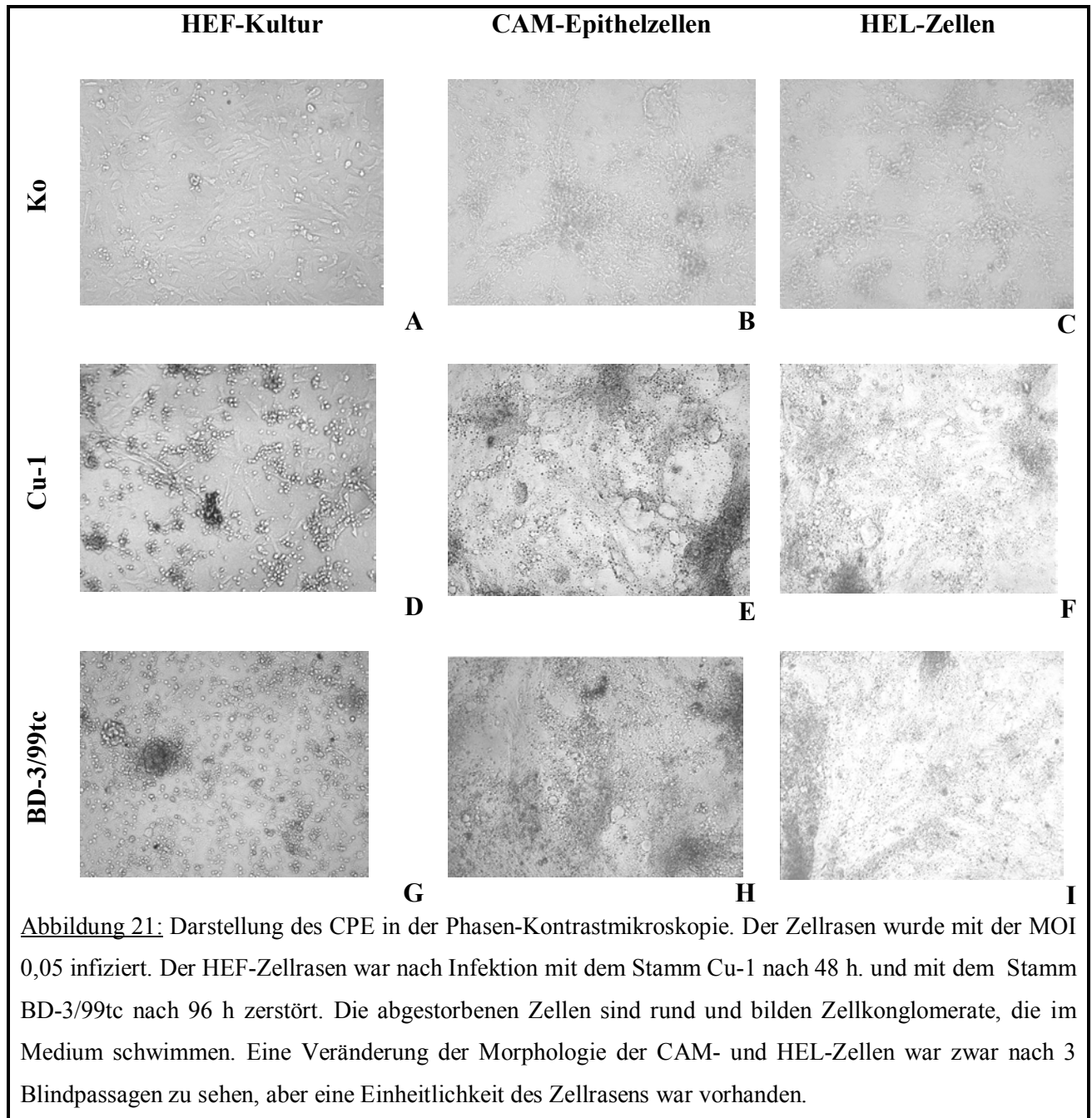
Abbildung 20: Analyse der Expression von IBDV-Proteinen 24 h nach Infektion (**A**) und nach 3 Passagen (**B**) post Infektion von HEF, CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen mit Cu-1 und BD-3/99tc. Die Western blots wurden mit dem Anti-IBDV-Antikörper B54 und mit dem biotinylierten Anti-Rabbit-Antikörper dargestellt. Nach der Zugabe eines Chloronaphtol-Substrats wurden die Antigen-Antikörper-Bindungen sichtbar gemacht. (**M**) Molekulargewichtsmarker (kDa); (**1**) Negativkontrolle; (**2**) Cu-1; (**3**) BD-3/99tc

3.3.2 Lichtmikroskopie des CPE

Die Vermehrung der Stämme Cu-1 und BD-3/99tc verursacht einen CPE in geeigneten Zellkulturen (s. Abb. 21). Der HEF-Zellrasen war nach Infektion (MOI 0,05) mit dem Stamm Cu-1 nach 48 h und mit dem Stamm BD-3/99tc nach 96 h zerstört. Die abgestorbenen Zellen waren rund und bildeten Zellkonglomerate, die im Medium schwammen (s. Abb. 21 D, G).

Da Cu-1 und BD-3/99tc nicht an CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen adaptiert sind, war der CPE in diesen Kulturen erst nach 3 Blindpassagen sichtbar. Eine Veränderung der Morphologie der CAM- und HEL-Zellen war zwar zu sehen, aber eine Einheitlichkeit des Zellrasens war vorhanden (s. Abb. 21 E, F, H, I). Dadurch wurde die Beurteilung des CPE erschwert. Die vom Virus infizierten Zellen starben ab, schwammen im Medium und bildeten die Konglomerate. Der unzerstörte Zellrasen bestätigt die Vermutung, dass die Epithelzellen auch *in*

in vitro relativ starke Zellverbindungen besitzen und dadurch die Infizierung der Zellen *in vitro* und die Zerstörung des Zellrasens nicht so deutlich ausgeprägt sind.



3.3.3 Wachstumskinetik

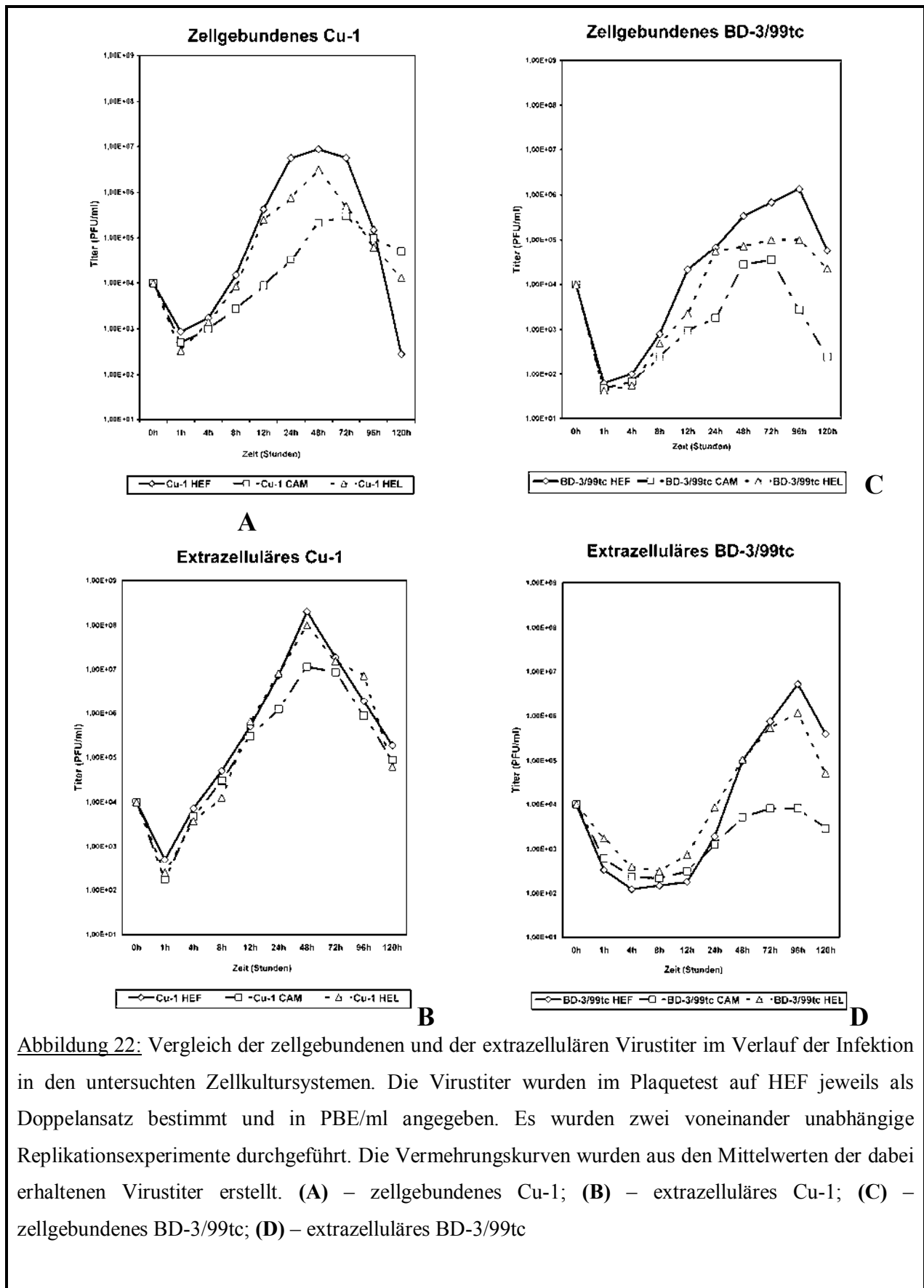
Zur Untersuchung der Replikationsgeschwindigkeit der verschiedenen IBDV-Stämme in HEF-, CAM- und HEL-Zellkulturen wurden Wachstumskurven erstellt. Dazu erfolgte die Infektion aller Zellkulturen mit 10^4 PBE/ml Virussuspension (MOI 0,05). Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96 und 120 h p.i.) wurden die Zellkulturüberstände gewonnen, bei 1000 x g 10 min zentrifugiert und die extrazellulären

Virustiter der Überstände mittels Plaquetest bestimmt. Zur Ermittlung der zellgebundenen Virustiter wurden die auf den Kulturschalen verbliebenen Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt p.i. dreimal mit PBS gewaschen und mit je 2 ml Kulturmedium ohne FKS und Antibiotikum bedeckt. Die vorher pelletierten Zellen der Zellkulturüberstände wurden zugefügt. Durch einen dreimaligen Einfrier- (-20 °C) und Auftauprozess sowie durch die anschließende 10-minütige Zentrifugation bei 1000 x g wurden die Zellen aufgebrochen und die Überstände für die Bestimmung der zellgebundenen Virustiter verwendet. Die Titration erfolgte im Plaquetest jeweils als Doppelansatz; aus den Mittelwerten wurde der Virustiter errechnet. Die Wachstumskurven der einzelnen Viren wurden aus den Mittelwerten der Titrationsergebnisse von zwei unabhängigen Replikationsexperimenten erstellt.

Die Wachstumskurven des Cu-1 zeigten, dass die Replikationsgeschwindigkeit des Virus in allen Zellkulturarten im Vergleich zu BD-3/99tc gleich schnell ist. Das Cu-1-Virus erreicht seinen Peak nach 48 h p.i. in der HEF-Kultur, aber sein Wachstum in den Epithelzellen ist langsamer und ein hoher Titer wird nach 48-72 h p.i. beobachtet. Obwohl Cu-1 nach 48 h p.i. einen hohen Titer aufweist, bleibt ein Unterschied zwischen den Titern von ca. 1 Logstufe für das in HEL-Zellen vermehrte Virus und von ca. 1,5-2 Logstufen für das in CAM-Epithelzellen vermehrte Virus (s. Abb. 22 A, B).

Die Replikationsgeschwindigkeit des mittels reverser Genetik hergestellten Virus BD-3/99tc ist deutlich langsamer als die des Cu-1. Der Wachstumspk war nach 96 h zu beobachten, und der Titerunterschied zwischen Cu-1 und BD-3/99tc in der HEF-Kultur beträgt 2 Logstufen. In den CAM-Epithelzellen vermehrt sich das BD-3/99tc noch langsamer als das Cu-1 und weist einen niedrigeren Titer auf. In den CAM-Epithelzellen beträgt der Titerunterschied zwischen Cu-1 und BD-3/99tc 3 Logstufen. (s. Abb. 22 C, D).

Außer deutlich unterschiedlichen Vermehrungsraten der beiden Viren ist auffallend, dass die intrazelluläre Virusvermehrung und die Virusfreisetzung des BD-3/99tc-Stammes verzögert sind. In den ersten 24 h vermehrt sich das Virus vor allem in den Zellen (s. Abb. 22 C). Erst nach 24 h p.i. ist ein Anstieg des freigesetzten Virus zu sehen (s. Abb. 22 D). Dagegen war extrazelluläre Infektiosität des Cu-1-Stammes schon nach 4 h p.i. zu finden (s. Abb. 22, B). Da diese Beobachtungen für alle drei Zellkulturarten gleich sind, lässt sich vermuten, dass die ausgewählte Zellart nur die Vermehrungsrate des Virus beeinflusst, aber keinen Einfluss auf die Biologie des Virus hat.



3.3.4 Fazit 3

- CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen unterstützen die Vermehrung der Stämme Cu-1 und BD-3/99tc.
- Im Vergleich zu der HEF-Kultur ist die Replikationsgeschwindigkeit der beiden untersuchten Viren sowohl in den CAM-Epithelzellen als auch in den HEL-Zellen langsamer.
- Der Stamm BD-3/99tc zeigt im Vergleich zum Cu-1-Stamm ein langsames Wachstum in allen Zellkultursystemen.
- Der Wachstumsspeak in den CAM-Epithelzellen ist nach 72-96 h p.i. für die beiden Viren zu sehen, aber der bestimmte Titer des Stammes BD-3/99tc ist 2 Logstufen niedriger als der des Stammes Cu-1.
- Durch die Analyse der Wachstumskinetik besteht die Vermutung, dass die verzögerte Virusvermehrung in den Epithelzellen mit dem Ursprung der Zellen korreliert.

3.4 Vermehrung der hv-IBDV-Stämme in den untersuchten Zellkulturarten

3.4.1 Beschreibung des Versuchs

Auf Grund der Vermehrung des hv-IBDV *in ovo* (s. Abschnitt 3.2) wurde vermutet, dass auch *in vitro* die CAM-Epithelzellen und Hühnerembryoleberzellen für die Vermehrung von hv-IBDV geeignet sein könnten. Die vorherigen Untersuchungen zeigten, dass die beiden Zelltypen *in vitro* die Replikation des zelladaptierten Virus unterstützen (s. Abschnitt 3.3). Weitere Versuche hatten zum Ziel, die untersuchten Zellkultursysteme auf ihre Fähigkeit zur Vermehrung von hv-IBDV-Stämmen zu prüfen.

Da die hv-Stämme BD-3/99wt und BD-3/99mc nicht in den bekannten Zellkulturen vermehrungsfähig sind, wurde entschieden, zunächst eine Virusvermehrung *in ovo* durchzuführen (s. Abschnitt 2.2.4.3). Dadurch wurde genügend vom virushaltigen Material zu Verfügung gestellt und gleichzeitig bestand die Möglichkeit, die biologischen Eigenschaften der Viren *in ovo* zu untersuchen. Als Kontrollstamm wurde der zellkulturadaptierte Stamm BD-3/99tc mit einbezogen, der ebenfalls durch eine Passage im Ei vermehrt wurde. Das virushaltige Material wurde, wie im Abschnitt 2.2.4 beschrieben, gewonnen, vorbereitet und gelagert.

Der Versuch hatte folgendes Schema: 200µl des 1:10 verdünnten und sterilfiltrierten CAM-Leber-Homogenats wurde auf den Zellrasen gleichzeitig mit der Zugabe des Erhaltungsmediuns gegeben und 4 Tage bei 38°C inkubiert. Wegen der erhöhten Empfindlichkeit der CAM-Epithelzellen wurde die einstündige Adsorption bei den allen Zellkulturen weggelassen. In zwei weiteren Passagen wurde 200µl von dem Material der vorherigen Passage zu den Zellrasen gegeben. Für diese Versuche wurden die 6-Loch-Gewebekulturschalen verwendet.

Am Ende der Bebrütung wurden die Zellen durch Trypsinierung gesammelt und mittels FACS 24 h p.i., IIFT 72 h p.i. und Western blot 96 h p.i. auf das Vorhandensein des Virusantigens untersucht. Das Virusgenom sollte mittels RT-PCR 96 h p.i. nachgewiesen und mit anschließender REA dem jeweiligen Virus-Stamm zugeordnet werden. Falls diese Erwartungen zu einem positiven Ergebnis führen sollten, sollte der kodierende VP2-Genomabschnitt mittels RT-PCR amplifiziert werden. Durch die nachfolgende Sequenz-Analyse sollte gezeigt werden, ob ein AS-Austausch im Virusgenom zu finden ist, und falls dies der Fall ist, nach welcher Passagenzahl. Weiterhin sollte gezeigt werden, mit welchen Veränderungen der biologischen Eigenschaften dieser AS-Austausch verbunden ist.

Der Versuch wurde dreimal mit jeweils drei aufeinander folgenden Passagen unter gleichen Bedingungen wiederholt. Die Ergebnisse der einzelnen Passagen sind nachfolgend dargestellt.

3.4.2 Nachweis von hv-IBDV nach der ersten Passage

3.4.2.1 *Analyse der viralen Proteine im Western blot*

Zum Nachweis der Virusproteine in den untersuchten Zellkulturen wurden die Proben 96 h p.i. mittels Western blot untersucht. Die Membran wurde zuerst mit dem Anti-IBDV-Antikörper B54 und danach mit dem biotinylierten Anti-Rabbit-Antikörper inkubiert. Durch die Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase und die Zugabe des Chloronaphtol-Substrats wurden die Antigen-Antikörper-Bindungen sichtbar gemacht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

Als Positivkontrolle für diesen Versuch wurde der zellkulturadaptierte Stamm BD-3/99tc benutzt. Die Menge des Virusproteins, die nach der 1. Passage im Western blot erreicht wurde (s. Abb. 23, Bahnen 1, 2) zeigte, dass eine Passage nicht reicht, um genügend Virusproteine herzustellen. Das ist darauf zurückzuführen, dass die untersuchten hv-IBDV-Stämme nicht an die CAM-Epithelzellen und an die HEL-Zellen adaptiert sind. Ein ähnliches Ergebnis wurde im

Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Zusammen mit dem IIFT (s. Abb. 24) schließt es die „falsch negativen“ Ergebnisse nicht aus. Bevor man eine endgültige Aussage treffen konnte, mussten sowohl andere Untersuchungen (IIFT, FACS-Analyse) als auch zwei weitere Passagen durchgeführt werden.

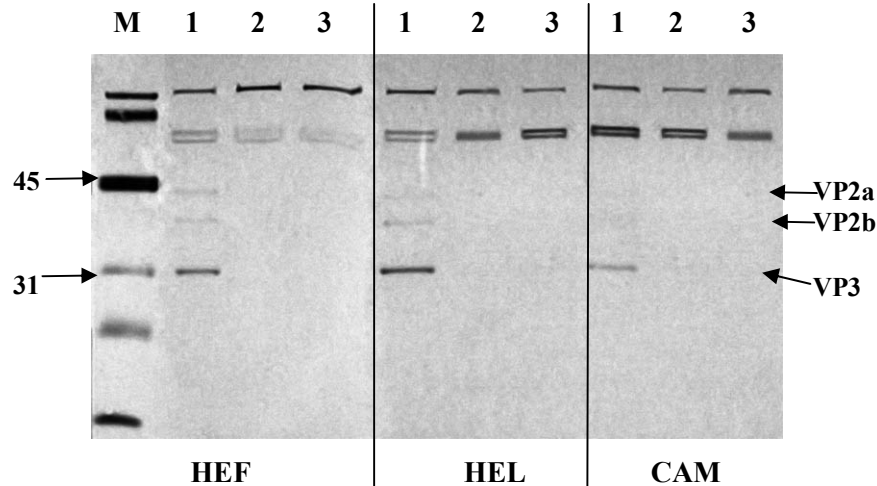


Abbildung 23: Analyse der Expression der IBDV-Proteine nach der ersten Passage, 96 h nach der Virusinfektion. Der Western blot wurde mit dem Anti-IBDV-Antikörper B54 und mit dem biotinylierten Anti-Rabbit-Antikörper dargestellt. Nach der Zugabe eines Chloronaphtol-Substrats wurden die Antigen-Antikörper-Bindungen sichtbar gemacht. (1) BD-3/99tc; (2) BD-3/99wt; (3) BD-3/99mc; (M) Molekulargewichtsmarker (kDa)

3.4.2.2 Nachweis des Virusantigens mittels IIFT

Nach der ersten Passage in der HEF-Kultur, den CAM-Epithelzellen und den HEL-Zellen wurden die jeweils mit den Stämmen BD-3/99tc, BD-3/99wt, BD-3/99mc infizierten Deckgläschen 72 h p.i. gewaschen und getrocknet, mit eiskaltem Methanol bei -4°C 15 min fixiert, zunächst mit den polyklonalen Anti-IBDV-Antikörper B54 inkubiert, dann mit einem FITC-markiertem Anti-Maus-Antikörper behandelt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass nur im Falle des Stammes BD-3/99tc in allen Testkulturen virales Antigen nachweisbar war (s. Abb. 24 J, K, L). Die Zellen, die mit hv-IBDV infiziert worden waren, blieben intakt (s. Abb. 24 D, E, G, H). Da die Stämme BD-3/99wt und BD-3/99mc nicht an die verwendete CAM-Epithelzellen, HEL-Zellen und HEF-Kulturen adaptiert sind, könnte das negative Ergebnis nach der ersten Passage im IIFT erwartet werden.

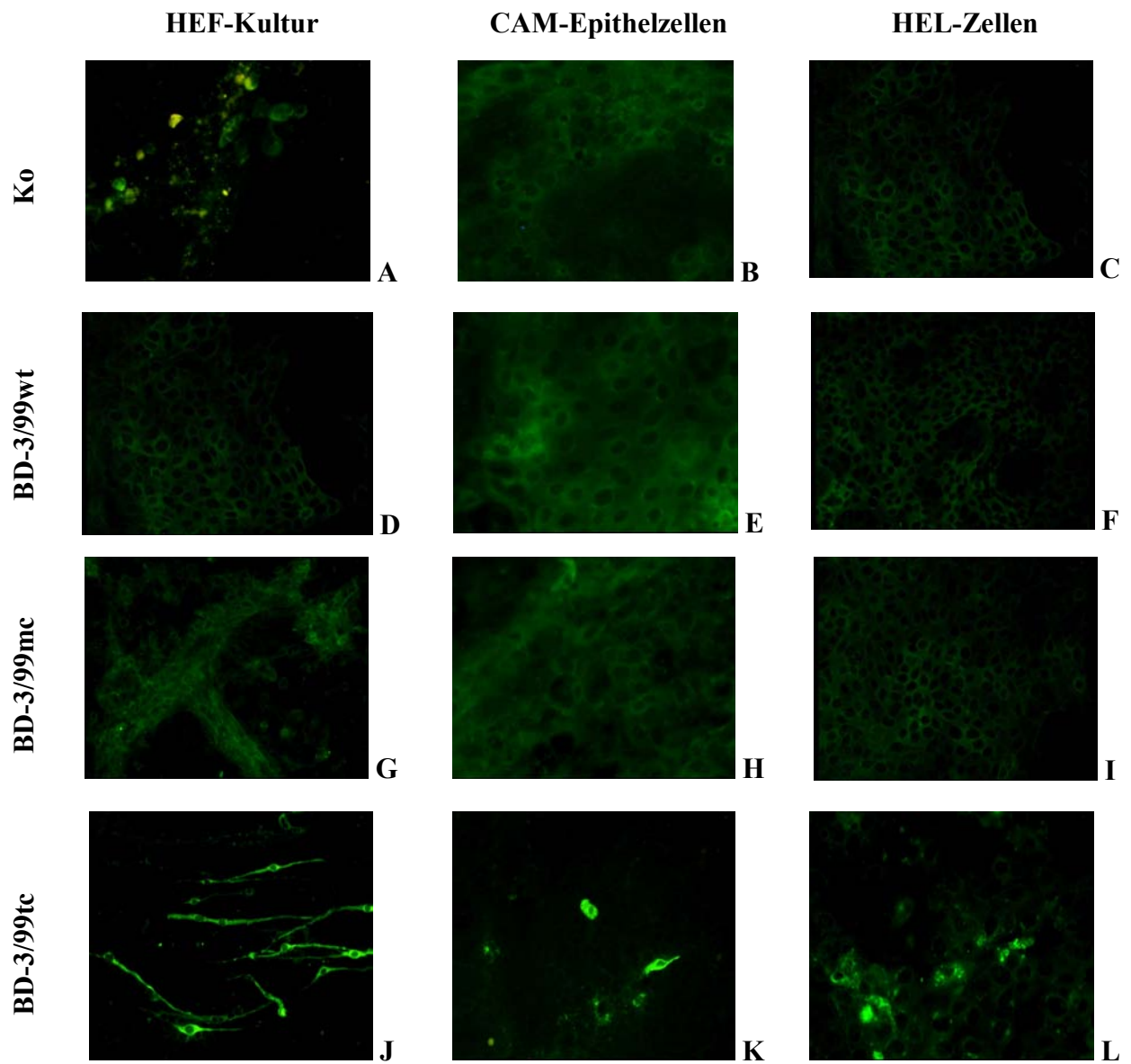


Abbildung 24: Darstellung des viralen Antigens nach der ersten Passage, 72 h p. i.. Für den Nachweis viraler Antigene wurde ein IIFT mit dem polyklonalen Anti-IBDV-Serum B54 durchgeführt und die Zellen im Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Zellen mit Virusantigenen sind durch eine intrazytoplasmatische Fluoreszenz zu erkennen.

3.4.2.3 *Quantifizierung zellgebundener Viren mittels FACS*

Ausgehend davon, dass mittels Western blot und IIFT keine viralen Antigene in CAM-Epithelzellen, HEL-Zellen und HEF-Zellen nachweisbar waren, wurde entschieden, die infizierten Zellen durch FACS zu analysieren. Dadurch sollte die Frage beantwortet werden, ob nicht doch kleine Mengen des Antigens nachweisbar waren.

Bei der FACS-Analyse wurden zunächst infizierte und schein-infizierte Zellen 24 h p.i. untersucht. Die Zellen wurden mit dem polyklonalen Anti-IBDV-Antikörper B54 inkubiert und mit dem FITC-markierten sekundären Antikörper gefärbt. Jeweils 10^4 Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die emittierte Energie des Fluorochroms FITC wurde gemessen und hinsichtlich die Fluoreszenzintensität der Zellen in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt (s. Abb. 25).

Im FACS-Diagramm wurden die Zellen nach ihrer Fluoreszenzintensität (Achse X) und nach der Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität (Achse Y) dargestellt. Je mehr vom viralen Antigen in der Zelle ist, umso größer ist die Fluoreszenzintensität dieser Zelle, somit wird die Rechtsverschiebung in den Bereich M_2 sichtbar. Die Zellen mit einer Fluoreszenzintensität zwischen 10^2 und 10^4 sind positiv bewertet. Die positiven Zellen befinden sich im Bereich M_2 . Die nicht infizierten Zellen sind im Bereich M_1 zu sehen.

Die Fluoreszenz, die bei der FACS-Analyse der schein-infizierten Kontroll-Zellen entstanden war, wurde als unspezifisch bewertet und aus den weiteren Berechnungen ausgeschlossen.

Die quantitative Analyse des nachweisbaren Virusantigens zeigt, dass die mit BD-3/99mc und BD-3/99wt infizierten Zellen ein etwa gleiches Ergebnis zeigten wie die schein-infizierten Zellen (s. Abb. 25 D, E, F, G, H, I). In diesem Fall liegt die Zahl der positiven Zellen sowohl bei virushaltigen Zellkulturen, als auch bei der Negativkontrolle zwischen 0,92 und 1,26% (s. Abb. 25 A, B, C). Dabei handelt es sich um eine unspezifische Färbung.

Die Zahl der positiven Zellen der mit BD-3/99tc infizierten Zellkulturen beträgt ca. 7% in der HEF-Kultur und ca. 4% in beiden Epithel-Kulturen (s. Abb. 25 J, K, L). Die FACS-Ergebnisse zeigten, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Zell-Infektion mit den Stämmen BD-3/99wt und BD-3/99mc stattgefunden hat.

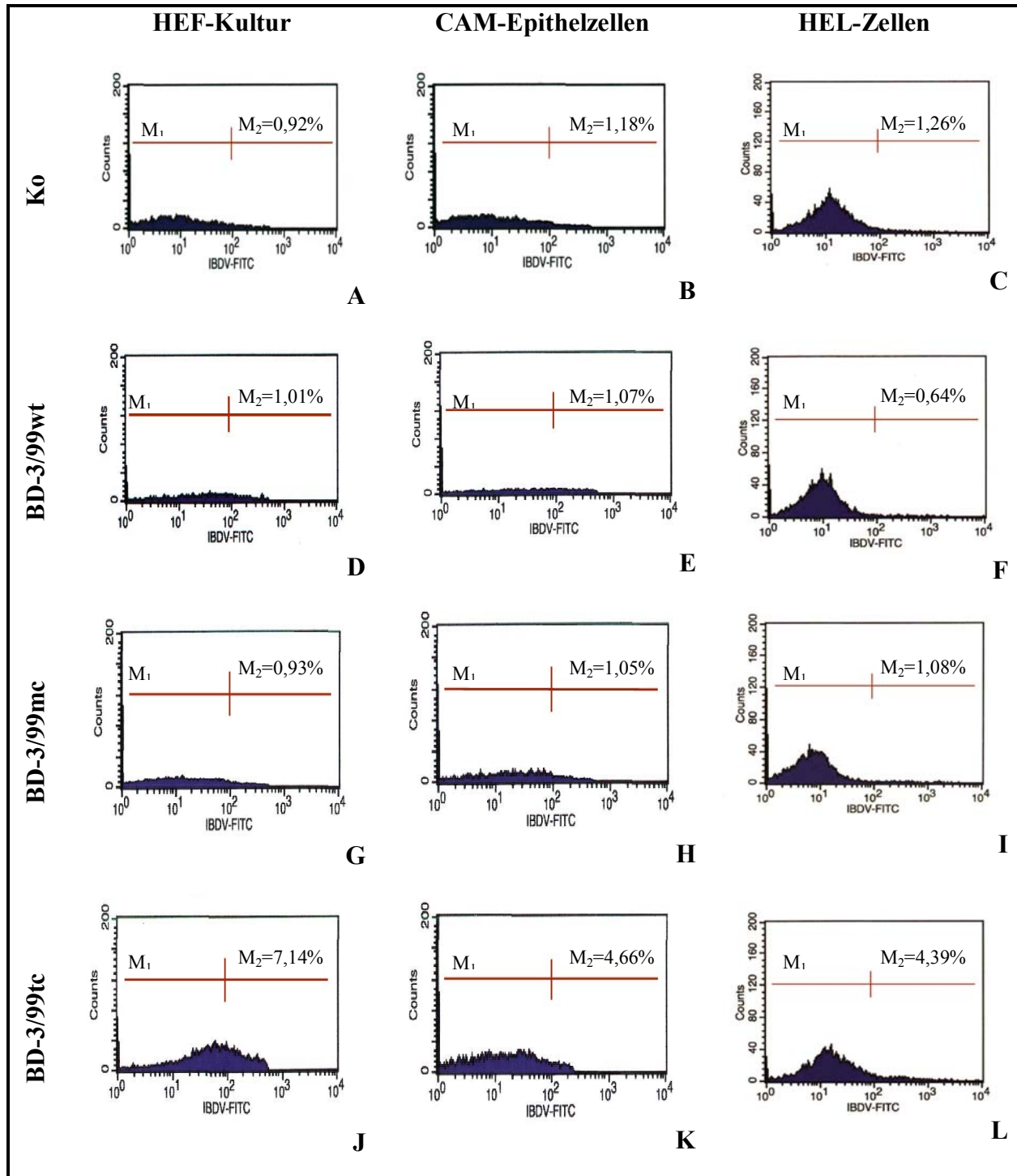


Abbildung 25: Untersuchung der infizierten Zellkultursysteme 24 h p.i. Die Ergebnisse wurden nach der Fluoreszenzstärke dargestellt. Die Proben wurden mit dem polyklonalen Anti-IBDV-Antikörper B54 gefärbt. Als Negativkontrolle wurde nur der FITC-markierte Anti-Spezies-Antikörper benutzt. Die positiven Zellen befinden sich im Bereich M₂.

3.4.2.4 *RT-PCR und REA*

Nach der ersten Passage war es nicht gelungen, deutlich positive Ergebnisse in Western blot, IIFT und in der FACS-Analyse zu erhalten. Die Charakterisierung der viralen Nachkommen erfolgte daher mittels der RT-PCR mit anschließender REA. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus den ca. 10^6 infizierten Zellen mit Hilfe des RNeasy Mini Kits® (Qiagen, Hilden) isoliert. Unter Verwendung des Primerpaares VP2R/VP2F (s. Abschnitt 2.1.8) und dem One Step RT-PCR Kit® (Qiagen, Hilden) wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die erhaltenen Produkte mit einer Größe von 723 bp schlossen den für die variable Region des VP2 kodierenden Genomabschnitt ein.

Nach der 1. Passage wurde ein positives Ergebnis in allen untersuchten Zellkultursystemen ermittelt (s. Abb. 26 A).

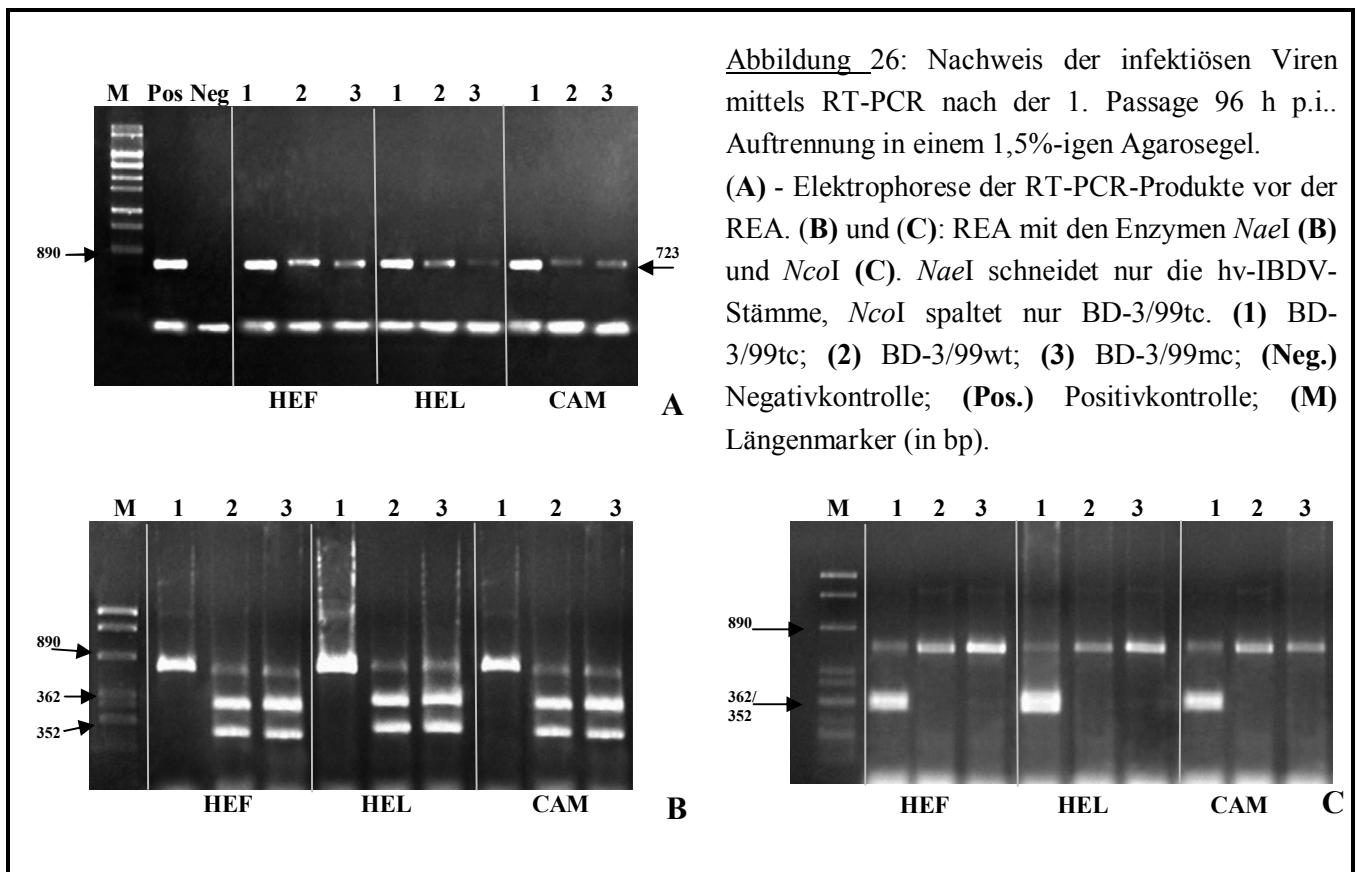
Für die Beantwortung weiterer Fragen wurden die erhaltenen RT-PCR-Produkte gereinigt (s. Abschnitt 2.2.10) und mit Hilfe von TA-Cloning Kit® (Invitrogen) in einen Vektor einkloniert (s. Abschnitt 2.2.11). Für die analytische REA mit einem Gesamtvolumen von 15 µl wurden 5 µl DNA-Lösung aus einer Plasmidpräparation mit einem Enzym und dem entsprechenden Puffergemisch für 2 h bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.

Die anschließende REA zeigte, dass die isolierten Fragmente von den hv-Stämmen BD-3/99wt und BD-3/99mc (s. Abb. 26 B) und vom zellkulturadaptierten BD-3/99tc-Stamm stammten (s. Abb. 26 C).

Die hv-IBDV-Stämme BD-3/99wt und BD-3/99mc wurden durch das Enzym *NaeI* gespalten, dagegen spaltete das Enzym *NaeI* das Isolat BD-3/99tc nicht (RAUE et al. 2004). Durch den Verdau mit dem Enzym *NaeI* entstanden nur bei den Proben, die mit den hv-IBDV-Stämmen BD-3/99wt und BD-3/99mc infiziert wurden, zwei Fragmente mit einer Größe von 352 und 362 bp (s. Abb. 26 B, Bahnen 2, 3).

Zur Unterscheidung zwischen dem zellkulturadaptierten Stamm BD-3/99tc und den hv-IBDV-Stämmen BD-3/99wt und BD-3/99mc wurden die RT-PCR-Produkte parallel mit dem Enzym *NcoI* inkubiert. Das Enzym *NcoI* spaltet nur den Stamm BD-3/99tc (s. Abb. 26 C, Bahn 1).

Nach der Infektion der Zellen ist in der 1. Passage das virale Genom nachweisbar. Es ist dabei aber nicht zu unterscheiden, ob es sich um das Genom der zur Infektion benutzten Viren oder um das von replizierten Viren handelt.

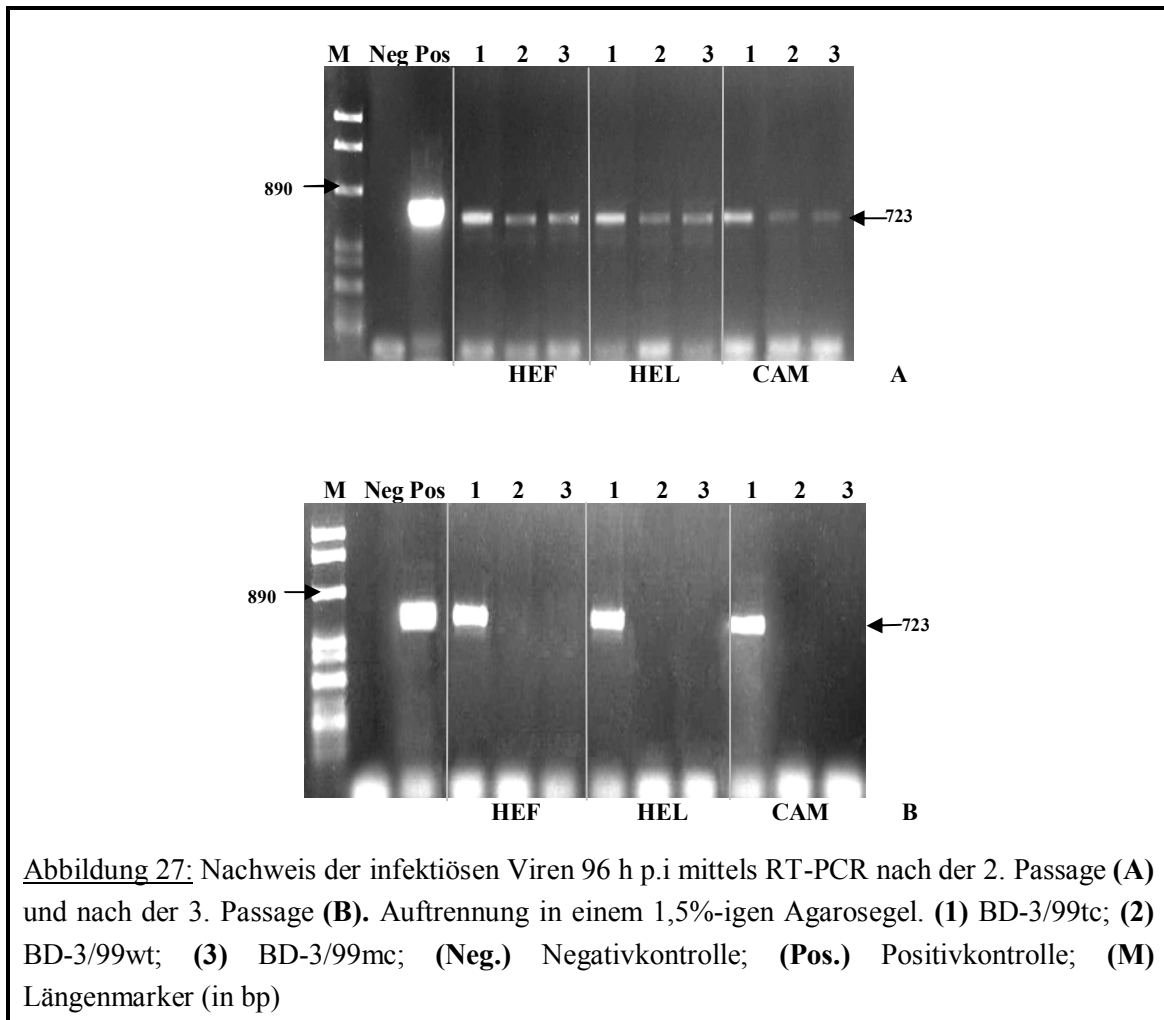


3.4.3

Nachweis von hv-IBDV nach der zweiten und dritten Passage

In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob es sich um Virus des Ausgangsmaterials handelt oder die Virusvermehrung in den untersuchten Zellkultursystemen langsam stattfindet. Im Falle einer Virusvermehrung wurde eine Vermehrung der PCR-Produkte nach weiteren Passagen erwartet. Wenn jedoch keine Zellkultur-Virusvermehrung eintritt, führt das zu einer negativen PCR.

Für die zweite Passage wurde das Material der ersten Passage dreimal gefroren und aufgetaut und 200 µl davon in ein Loch einer 6-Loch-Platte gegeben. Die Gewinnung des infektiösen Materials wurde nach 96 h p.i. vorgenommen. Als erster Test wurde die RT-PCR durchgeführt. Dadurch sollte gezeigt werden, ob es sich um eine Vermehrung oder Verminderung des PCR-Produktes handelt. In vorliegendem Fall war zu erkennen (s. Abb. 27 A), dass sich die Menge des amplifizierten VP2-Fragmentes deutlich vermindert hatte. Ausgehend davon wurde vermutet, dass es sich um das Ausgangsvirus BD-3/99wt bzw. BD-3/99mc handelt, welches im Material der ersten Passage noch vorhanden war. Hingegen ist eine deutliche Vermehrung des BD-3/99tc festzustellen (s. Abb. 27 B).



Die Ergebnisse der dritten Passage zeigten, dass BD-3/99wt und BD-3/99mc nicht mehr vorhanden sind. Dagegen ist eine weitergehende Vermehrung des BD-3/99tc festzustellen (s. Abb. 27 B).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde auf die weitergehende FACS-Analyse, den Western blot und den IIFT verzichtet. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der ersten Passagen. Es findet keine Vermehrung von hv-IBDV (BD-3/99wt und BD-3/99mc Stämme) statt.

3.4.4 Fazit 4

- Nach drei Versuchen mit jeweils drei aufeinander folgenden Passagen konnte keine RNA der hv-IBDV-Stämme in HEF-Zellen, HEL-Zellen und CAM-Epithelzellen nachgewiesen werden.
- Die Vermehrung von BD-3/99tc wurde in HEF-Zellen, CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen nach der Passage im embryonierten Ei bestätigt.

3.5 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit geprüft, die hv-Stämme BD-3/99wt und BD-3/99mc ohne Veränderungen des Genoms *in vitro* zu vermehren. Diese Aufgabe sollte dazu dienen, die biologischen Eigenschaften dieser Stämme untersuchen zu können und ein einfaches diagnostisches System für die hv-IBDV-Stämme zu finden.

Ausgehend von der Vermehrung des IBDV *in ovo* wurden eine primäre Zellkultur aus den CAM-Epithelzellen etabliert und ihre biologischen Eigenschaften hinsichtlich der Virusvermehrung geprüft.

Die CAM-Epithelzellen sind *in vitro* sehr schwer anzüchtbar. Deswegen war es erforderlich, im Rahmen dieser Arbeit die geeigneten Bedingungen für die Kultivierung von CAM-Epithelzellen durchzuführen. Für die Gewinnung der CAM-Epithelzellen wurde eine Vorbehandlung mit Kollagenase-Hyaluronidase-Gemisch und danach eine fraktionierte enzymatische Behandlung mit Trypsin-EDTA verwendet. Bei Aussaat der Zellen war eine hohe Zelldichte notwendig, um den Fibroblastenüberwuchs zu unterdrücken. Eine geeignete Zelldichte von 4×10^6 Zellen/ml wurde ermittelt. Die Supplementierung des serumfreien Ham's F12-Medium mit Na-Pyruvat 1:1000, 6 mM Glutamin, Penicillin-Streptomycin 1:100, 10 mM Hepes, 10N NaOH 30 µl/100ml, 5 µg/ml Insulin, ITS 1:100, synthetischem Serumersatz 1:1000 und 5 nM Dexamethason liefert die besten Ergebnisse. Es reicht ein Mediumwechsel nach 48 h mit Ham's F12-Basismedium (Na-Pyruvat 1:1000, 6 mM Glutamin, Penicillin-Streptomycin 1:100, 10 mM Hepes, 10N NaOH 30 µl/100ml) mit einem auf 1,3 mM erhöhtem Ca^{2+} -Gehalt. Unter diesen Bedingungen war der Wachstumspeak zwischen dem 3. und dem 4. Tag zu beobachten, und es handelt sich um eine „short-term-Kultur“. Die PDT betrug ca. 16 h, die Generationszahl ca. 6 Generationen in den ersten 4 Tagen. Die Zellkultur war ca. 8 Tage lebensfähig.

Durch die Vorbereitungsuntersuchungen wurde festgestellt, dass die etablierte CAM-Zellkultur die Vermehrung der zellkulturadaptierten Stämme Cu-1 und BD-3/99tc unterstützt. Das Ergebnis zeigte eine verzögerte Vermehrung dieser Stämme in den CAM-Epithelzellen. Das könnte dadurch bedingt sein, dass das Epithelgewebe einen Schutz gewährleistet und als erste Barriere gegen die Infektion dient.

Da in der Leber des Embryos eine Virusvermehrung stattfindet, wurden die Embryohepatozyten bzw. HEL-Zellen mitgeprüft. Die HEL-Zellen zeigten zwar eine schnellere Virusreplikation als die CAM-Epithelzellen, erwiesen sich aber trotzdem nicht so geeignet für die Virusvermehrung wie HEF-Kulturen.

Es wurden auch unterschiedliche biologische Eigenschaften, sowohl der Zellkulturen als auch der Virusstämme, festgestellt. Der mittels reverser Genetik hergestellte zellkulturadaptierte Stamm BD-3/99tc hatte einen verlängerten Replikationszyklus in allen Zellkulturen mit dem Vermehrungspeak 96 h p.i. Bei dem Stamm Cu-1 war dieser Peak schon nach 48 h p.i. zu sehen. Die hv-IBDV-Stämme BD-3/99mc und BD-3/99wt und der cv-IBDV-Stamm Cu-1 Stamm wiesen eine hohe Embryoletalität *in ovo* auf. Die Vermehrung des Stammes BD-3/99tc *in ovo* bestätigte den Virulenzverlust nach genetischen Veränderungen, die zu einer Zelladaptation führen.

Obwohl die Zellkulturen auf Grund der Biologie der Virusvermehrung *in ovo* entwickelt wurden, zeigten die Versuche, die hv-IBDV-Stämme auf CAM-Epithelzellen, HEL-Zellen und HEF-Kultur zu züchten, ein negatives Ergebnis. Das könnte daran liegen, dass die Zellen *in vitro* entweder keine Rezeptoren besitzen, die für die Virusaufnahme in der Zelle verantwortlich sind, oder die Faktoren fehlen, die *in vivo* und *in ovo* eine essentielle Rolle bei der Virusvermehrung spielen.

Eine weitere Vermutung, die diese Ergebnisse erklären könnte, ist die biologischen Eigenschaften der Epithelzellen hinsichtlich ihres Wachstums. Die Fibroblasten sind eine sich schnell teilende Zellart, und im Zeitpunkt der Infizierung sind mehrere Zellen in ihrer Mitose-Phase. MÜLLER (1986a) und MÜLLER (1987) berichteten, dass ca. 20 % der Bursalymphozyten die Replikation des Stammes Cu-1 unterstützen. Die hier verwendete CAM- und HEL-Zellen sind langsam teilende Zellarten. Vermutlich waren nicht genügend teilungsaktive Zellen im Zellrasen, in denen eine Virusvermehrung stattfinden könnte.

Obwohl diese Untersuchungen keine Vermehrung der hv-IBDV-Stämmen in den Zellkulturen nachwiesen, zeigte diese Arbeit aber dennoch, dass die etablierten und die in dieser Arbeit untersuchten CAM-Epithelzellen in allgemeinen virologischen und zellbiologischen Studien weiter verwendet werden könnten.

4 Diskussion

4.1 Etablierung einer Zellkultur aus CAM-Epithelzellen

Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit waren die Etablierung der Primärzellkultur der CAM-Epithelzellen, die immunhistochemische Charakterisierung der Zellen mit dem Nachweis von Zytokeratin sowie Untersuchungen zur Feststellung der Möglichkeiten der Verwendung dieses Zellkultursystems für allgemeine virologische Untersuchungen, insbesondere die Virusisolierung. In diesem Zellkulturmodell sollte überprüft werden, ob die in den anderen Zellkulturen nicht vermehrungsfähigen hv-IBDV-Stämme BD-3/99wt und BD-3/99mc isoliert werden können.

Da die CAM des Hühnereies sehr sensitiv in Bezug auf die Vermehrung der IBDV ist und sich zuerst die Chorionepithelzellen infizieren lassen, wurde überlegt, ob *in vitro* das gleiche Schema ausführbar ist.

MÜLLER (1986a), BURKHARDT und MÜLLER (1987) haben nachgewiesen, dass die aus 10 Tage alten Küken gewonnenen Bursalymphozyten sehr empfindlich gegenüber der Infizierung mit dem cv-IBDV sind. Dieses Material für die Herstellung der Zellkulturen ist teuer und aus Tierschutzgründen nicht ansetzbar.

Ein anderer Grund, warum die primären CAM-Epithelzellen in Frage kamen, waren die biologischen Eigenschaften der primären Zellkultur. Während es sich bei einer Langzeitkultur um transformierte Zellen, also „Tumorzellen“ mit unbegrenztem Wachstum handelt, werden die primären Zellen direkt nach Entnahme aus dem Organismus kultiviert. Mit den Primärzellkulturen hat man am ehesten die Möglichkeit, unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen zu arbeiten.

Bei der Herstellung der HEF-Kultur gibt es die Möglichkeit, gleichzeitig noch eine primäre Zellkultur ohne zusätzliche Kosten herzustellen. Der ausgewählte Zeitpunkt ist der 10. Bebrütungstag. Zu dem Zeitpunkt ist die CAM vollentwickelt und die Epithelzellen sind differenziert (ROMANOFF 1960). Diese Aussage wird durch hier beschriebene Versuche bestätigt (s. Abb. 4).

Bei der Kultivierung der CAM-Epithelzellen wurde auf zahlreiche Veröffentlichungen zurückgegriffen (WAYMOUTH 1974; BOTTENSTEIN et al. 1979; BOYCE u. HAM 1983; BERTOLERO et al. 1986; ITAMI et al. 1999; JASMUND et al. 2002).

Das Digestionsverfahren und die Kulturbedingungen wurden durch mehrere Versuche für die CAM-Epithelzellen festgelegt. Bei der Isolierung der CAM-Epithelzellen wurde berücksichtigt, dass ektodermalen Chorionepithel und endodermalen Allantoisepithel aus Zwei-

bzw. Einzell-Schicht der Epithelzellen bestehen (LEESON u. LEESON 1963). Um die Zellen zu erhalten, wurde entschieden, den unzerkleinerten Zustand der CAM zu bewahren. Bei der Bearbeitung der CAM wurde bemerkt, dass maximal fünfzehn CAM pro Einsatz zu digestieren sind. Bei den größeren Mengen bilden die CAM ein Konglomerat, in dessen Folge die Ausbeute der reinen Epithelzellen gering ist.

Die benutzte Konzentration von Enzymen wurde niedrig ausgewählt (s. Tab. 1, Spalte 6). Das sorgt für eine schonende Behandlung des Gewebes. Die Zugabe von EDTA unterstützte die Trypsinierung. Diese Beobachtungen stimmen mit den Literaturangaben überein (JAMES et al. 1979; FUJIE et al. 1996; HOLLANDER et al. 2000; CLAYTON et al. 2004). Das Phosphat im Digestionspuffer wurde, nach Austestung anderer Puffersubstanzen, durch Hepes ersetzt, da dieses die Wirkung von Enzymen nicht behinderte und zudem, wie auch FERBER und Mitarb. (1972) berichteten, einen positiven Effekt auf die Konservierung der Enzymaktivität hatte. JASMUND (2002) benutzte bei der Herstellung der primären Hepatozyten den Hepes-haltigen GKN-Puffer für die Vorbereitung der Kollagenase-Lösung. Mittels FACS-Analyse wurde gezeigt, dass der Anteil der Keratin-positiven Zellen in der frischen Zellsuspension ca. 40% beträgt (s. Abb. 6 B, C).

Das FKS begünstigt ein unerwünschtes Wachstum von Fibroblasten (BERTOLERO et al. 1986; SANTOS et al. 2003). Da die PDT der Fibroblasten ca. 6 h beträgt und damit wesentlich kürzer als die der Epithelzellen ist (ca. 16 h), kam es im serumhaltigen Medium zum Unterdrücken der Vermehrung der Epithelzellen. Dagegen wurde beobachtet, dass ein serumfreies Medium die PDT der Fibroblasten verlängert bzw. deren Wachstum unterdrückt. Da die angesäte Anzahl der Epithelzellen relativ hoch sein muss (JASMUND et al. 2002), kam es unter serumfreien Bedingungen nicht zum Fibroblastenüberwuchs. Es wurde aber beobachtet, dass der Zellrasen nach 48 h geschlossen oder mindestens zu 80% gebildet sein muss, sonst führt nach 72 bzw. 96 h die Vermehrung der Stromazellen zum Fibroblastenüberwuchs. Die gleichen Beobachtungen wurden von GIRJES und Mitarb. (2003) beschrieben. Obwohl die verwendeten Primärzellkulturen immer einen geringen Anteil an Stromazellen enthielten (s. Abschnitt 3.1.3) kam es unter den in dieser Arbeit etablierten Bedingungen nie zu einem „Überwuchs“ der Epithelzellen durch die Stromazellen.

Obgleich mehrere Autoren die Verwendung von kollagenbeschichteten Gewebekulturschalen für die Kultivierung der Epithelzellen für wichtig halten (DAHER et al. 2004), zeigte die Kultivierung der Zellen auf der Kunststoffoberfläche der Kulturschalen in den hier beschriebenen Versuchen einen Erfolg. CURSIEFEN und BECHT (1975) zeigten, dass die Benutzung der kollagenbeschichteten Platten zwar nicht zu einem besseren Wachstum führte, aber die Lebensdauer der Zellen verlängerte. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen

ging es um eine „short-term-Kultur“. Unter den vorgestellten Bedingungen war es möglich, den Zellrasen 8 Tage am Leben zu halten (s. Tab. 3). Die Versuche zeigten, dass die Kultivierungszeit des IBD-Virus zwischen 2 und 4 Tage liegt (s. Abb. 22), und deswegen war eine Kollagenbeschichtung der Gewebekulturplatte nicht erforderlich.

Ein anderer Aspekt, der für die Kultivierung der CAM-Epithelzellen interessant war, ist der Ca^{2+} -Gehalt (s. Abb. 7). Wie bereits in der Literatur beschrieben wurde, ist für die Kultivierung der Epithelzellen ein wesentlich kleinerer Ca^{2+} -Gehalt notwendig (BOYSE u. HAM 1983; ODA et al. 1990; SEO et al. 2004). Ein niedrigerer Ca^{2+} -Gehalt fördert das Wachstum der Zellen und deren Differenzierung (BERTOLLERO et al. 1984; GIBBS et al. 2000; WISCHE et al. 2003; SEO et al. 2004; DAHER et al. 2004). Es wurde bei der Mediauswahl in den hier beschriebenen Versuchen beobachtet, dass die CAM-Epithelzellen in Ca^{2+} -reichem Medium (Dulbecco, Dulbecco/F12) nur Kolonien bilden, sich aber niemals zu einem Zellrasen schließen. Um den Ca^{2+} -Gehalt in einem gewünschten Rahmen zu halten, wurde das Nutrient Mixture Ham's F12 ausgewählt. Mehrere Arbeitsgruppen (BOYCE u. HAM 1983; ODA et al. 1990; WICHE et al. 2003; SEO et al. 2004) zeigten bereits früher, dass Ham's F12 das Wachstum der Epithelzellen fördert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die CAM-Epithelzellen in FKS-freiem Ham's F12 Medium kultiviert. Um den Verlust von FKS auszugleichen, wurden Insulin, ITS, Dexamethason, Glutamin und synthetischer Serumersatz zugefügt (s. Schema 2). Die Auswahl der zugegebenen Mengen von Zusatzstoffen basierte auf vielen Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen (BOTTENSTEIN 1979; HU et al. 1992; RÖPKE 1997; GUIDRY et al. 1998; GIRJES et al. 2003; SONG et al. 2004).

Die Supplementierung des serumfreien Ham's F12-Medium mit Na-Pyruvat 1:1000, 6 mM Glutamin, Penicillin-Streptomycin 1:100, 10 mM Hepes, 10N NaOH 30 $\mu\text{l}/100\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insulin, ITS 1:100, synthetischem Serumersatz 1:1000 und 5 nM Dexamethason förderte das Wachstum der Zellen, welche nach Morphologie (s. Abb. 9), Phänotypbestimmung (s. Abb. 10) und Biologie (s. Tab. 2, 3) die Eigenschaften der Epithelzellen erkennen ließen. Der Mediumwechsel fand nach 48 h statt. Dafür wurde ein F12-Basismedium benutzt, in welches zusätzlich 1 mM Ca^{2+} zugegeben wurde.

Eine Aufgabe bei der Etablierung der Primärzellkultur bestand in der strukturellen Charakterisierung der Kultur. Mit Hilfe des IIFT, des Western blot und der FACS-Analyse wurden sowohl frisch gewonnene als auch gewachsene Zellen geprüft. Da die Zellen im kultivierten Zustand nicht mehr eindeutig ihrem histologischen Ursprung zuzuordnen waren, war es schwierig, ohne Hilfsmittel die vorliegende Zellart zu bestimmen. Deshalb wurden alle Untersuchungen sowohl mit der frischen Zellsuspension, als auch mit dem abgelösten Zellrasen

durchgeführt. Mit Hilfe eines Anti-Zytokeratin-Antikörpers und eines Anti-Vimentin-Antikörpers wurde in allen Untersuchungen sichtbar, dass es sich nicht um eine reine Epithelzellkultur handelte, sondern um eine Epithelzellkultur mit einem geringen Anteil (bis zu ca. 16%) an Stromazellen (s. Abb. 6 D, E). BRZOSKA und Mitarb. (2005) zeigten, dass der IIFT nicht immer für den Nachweis des Intermediärfilaments Zytokeratin geeignet ist und oft vom Differenzierungsstadium der Zellen abhängt.

Der Western blot dagegen liefert bessere Ergebnisse, unabhängig von einer Zelldifferenzierung. Im Western blot wurde nachgewiesen, dass sowohl die frischisolierten CAM-Epithelzellen (s. Abb. 5) als auch die Zellen *in vitro* nach 48 und 96 Kultivierungsstunden (s. Abb. 8 A) das Zytokeratin exprimierten.

Die FACS-Analyse macht es möglich, eine schnelle quantitative und qualitative Untersuchung der entstehenden Zellsuspension durchzuführen. HE und Mitarb. (2004) haben mittels FACS Analyse gezeigt, dass die Menge der Ovalzellen (kleine, einkernige, wenig differenzierte, bipotenete Zellen, die *in vivo* wie *in vitro* zu Hepatozyten und Epithelzellen der Gallengänge differenzieren) in der Leberzellfraktion von der Isolierungsmethode abhängt. Bei den verschiedenen Isolationsmethoden lag die Zellernte zwischen 32,3 und 80%. CLAYTON und Mitarb. (2004) zeigten, dass die Zahl der isolierten CK18-positiven menschlichen Milchdrüsenzellen zwischen 33 und 43% lag.

Die in dieser Arbeit verwendete Vorbehandlung mit einem Kollagenase-Hyaluronidase-Gemisch und die weitere fraktionierte Trypsin-EDTA Behandlung ermöglichte einen Gehalt an CAM-Epithelzellen in der Zellsuspension zwischen 31,55 und 44,86% zu erreichen (s. Abb. 6 B, C). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den oben genannten Beispielen und bestätigt die Auswahl der *in vitro*-Bedingungen für die Gewinnung der CAM-Epithelzellen.

Eine andere Arbeitsgruppe präsentierte, dass die Reinheit der Epithelzellkultur mit der Zahl der Passagen steigt. Ihr war es gelungen, nach 10 Passagen eine 98,4%-reine Epithel-Zellkultur von dem menschlichen Pterygium *in vitro* zu bekommen (GIROLAMO et al. 1999). In den hier beschriebenen Versuchen hingegen war es nicht möglich, die CAM-Epithelzellen zu passagieren.

Eine Mischkultur hat den Vorteil, dass die Kultur unter *in vitro*-Bedingungen eher den *in vivo*-Bedingungen ähnelt als eine Monokultur. Die wenigen Stromazellen behinderten das Wachstum der Epithelzellen nicht. Hinsichtlich der Morphologie der Zellen in Kultur konnten die Ergebnisse anderer Studien bestätigt werden. Es wird von wirbelartigen Ansammlungen der mehr rundlichen Epithelzellen mit Ausprägung von zytoplasmatischen Ausläufern sowie von elongierten Stromazellen berichtet.

4.2 Virus-Vermehrung in den embryonierten Hühnereiern

Um alle Versuche unter gleichen Bedingungen durchführen zu können, wurde entschieden, alle in die Arbeit einbezogenen Viren in Eipassagen zu vermehren. Da jedoch bekannt war, dass mehrere Eipassagen zum Absinken der Pathogenität führen können (YAMAGUCHI et al. 1996a; HASSAN et al. 1996;; ABDEL-ALIM u. SAIF 2001a; ABDEL-ALIM u. SAIF 2002), wurde entschieden, nicht mehr als zwei Passagen durchzuführen.

Ausgehend von der embryonalen Entwicklung der Bursa Fabricii wurde eine andere Aufgabe gestellt, und zwar, die Frage zu beantworten, wie die Virusvermehrung in der Leber und in der CAM *in ovo* stattfindet und welche Mengen an infektiösem Virus für die weiteren Untersuchungen zu gewinnen sind.

Ein anderer Grund, warum die CAM und die Leber im Interesse dieser Arbeit standen war, durch einen Versuch festzustellen, ob die CAM-Epithelzellen und die primären Embryohepatozyten Vermehrung von hv-IBDV *in vitro* unterstützen. Diese Vermutung basierte auf der Pathogenese der IBD, der Replikation des IBDV *in ovo* und *in vivo* (s. Abschnitt 1.1.5) und der allgemeinen Embryonalentwicklung (s. Abschnitt 1.2).

Die CAM-Inokulation der 9-11 Tage alten Embryonen ist empfindlicher als die Inokulation der Allantoishöhle (HITCHNER et al. 1971; WINTWRFIELD et al. 1972; YAMAGUCHI et al. 1996a; ABDEL-ALIM u. SAIF 2001a). Als Beimpfungstermin wurde der 11. Bebrütungstag ausgewählt. Diese Wahl hatte ihren Grund darin, dass am 11. Tag der Embryonalentwicklung die Einwanderung von Lymphoblasten aus der Peripherie in die Bursaanlage einsetzt und damit die Entwicklung der BF, des Hauptangriffsorgans des Virus, gerade beginnt. In den hier beschriebenen Versuchen wurde bei diesem Beimpfungstermin das unspezifische Absterben der Embryonen innerhalb von 24 h nur selten beobachtet.

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass sowohl v-IBDV als auch hv-IBDV *in ovo* nach 3 Tagen ihren maximalen Titer erreichen (SCHÜNEMANN 1986; YAMAGUCHI et al. 1996a; ABDEL-ALIM u. SAIF 2001a). Im Vergleich zur CAM-Inokulation entstehen bei der Inokulation der Allantoishöhle um 1,5-2,0 lg niedrigere Titer (LUKERT u. SAIF 1997). Die Inokulation des Dottersacks ist auch anwendbar, jedoch zeigten YAMAGUCHI und Mitarb. (1996b), dass die pathologisch-anatomischen Veränderungen erst nach 5-6 Tagen zu sehen und schwächer als bei der CAM-Inokulation ausgeprägt sind. Ausgehend von diesen Kenntnissen wurden die in dieser Arbeit geprüften Stämme Cu-1, BD-3/99tc, BD-3/99wt und BD-3/99mc auf der CAM in den Dosen, die in Tabelle 4 angegeben sind, zugegeben und nach 72 h geerntet.

Die Vermehrung des Virus in der CAM und in der Leber wurde mittels IHC festgestellt (s. Abb. 12, 14). Damit sind die Vermutungen, dass sowohl die CAM-Epithelzellen als auch die

embryonalen Hepatozyten *in vitro* für die Virusanzucht geeignet sein könnten, bestätigt. Die Versammlungen der antigenhaltigen Zellen rund um die CAM-Gefäße sprechen dafür, dass das auf die CAM gegebene Virus weiter mit der Blutbahn in den Embryo geliefert wird und dort die Virusvermehrung stattfindet.

Bei der Ermittlung der Infektiosität in EID₅₀/0,1ml (s. Tab. 5) der Stämme Cu-1, BD-3/99wt und BD-3/99mc war eine Steigerung der Virulenz deutlich sichtbar (s. Tab 6). Der BD-3/99mc besitzt im Vergleich zu BD-3/99wt geringere Infektiosität in EID₅₀/0,1ml. Ein ähnlicher Unterschied wurde in einer Vergleichsuntersuchung sowohl bei den Stämmen Cu-1 und Cu-1mc als auch bei den Stämmen 23/82 und 23/82mc beschrieben (OBERLÄNDER 2004).

Die Vermehrung des Stammes BD-3/99tc zeigte dagegen einen Rückgang der Virulenz (s. Tab. 6). Der BD-3/99tc ist ein zellkulturadaptierter Stamm, der mittels reverser Genetik hergestellt wurde. Die Eigenschaften dieses Stammes wurden von RAUE und Mitarb. (2004) in Tierversuchen untersucht. Die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigen auch *in ovo* die Aussage, dass die zellkulturadaptierten hv-IBDV keine sichtbaren pathologisch-anatomischen Veränderungen verursachen (HASSAN et al. 1996; ABDEL-ALIM u. SAIF 2001b; RODRIGUEZ-CHAVEZ et al. 2002; RAUE et al. 2004). Die beobachteten allgemeinen pathologisch-anatomischen Veränderungen der mit den Stämmen Cu-1, BD-3/99wt und BD-3/99mc infizierten Embryonen (s. Abb. 13) waren identisch mit denen, die in der Literatur beschrieben sind (LUKERT u. SAIF 1997).

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass der Virustiter des Stammes Cu-1 nach zwei Passagen in der Leber $2,75 \times 10^7$ PBE/ml erreicht (s. Tab. 5). Ein Vergleich der Virusvermehrung in der Leber und in der CAM zeigte, dass die meisten Virusantigene in der Leber nachgewiesen wurden (s. Tab. 5). SCHÜNEMANN (1986) untersuchte eine persistierende Infektion des IBD-Virus in Hühnerembryonen. Sie stellte fest, dass die Vermehrung des Stammes Cu-1 in den embryonalen Bursa-, Milz- und Thymusanlagen, in Leber, Niere und Gehirn, in der CAM und in der Allantoishöhle stattfindet. Die Titer in den lymphoiden Organen lagen jedoch 2 bis 3 Titerstufen höher als in den anderen Organsystemen. Versuche, die von KÄUFER und WEISS (1980) mit dem Stamm Cu-1 *in vivo* durchgeführt wurden, bestätigten, dass in der Leber infektiöses Virus zu finden ist. Die Titer waren zwar um 2 lg niedriger als in der Bursa Fabricii, erreichten aber trotzdem 3×10^6 PBE/ml. VAN DEN BERG (2004) benutzte die Leber des Embryos, um den Antigennachweis in capture-ELISA durchzuführen. ABDEL-ALIM und SAIF (2002) haben für ihre Versuche die CAM, die Leber und die Milz entnommen. Die Vakzinationsversuche von CRNIC und Mitarb. (2006) zeigten, dass das Vakzinevirus in der Leber schon 4 h nach der Impfung zu finden ist. Bei der Untersuchung der

Bursa Fabricii Cu-1-infizierter Hühner auf viralen Antigene war erst 12 h p.i. eine positive Reaktion zu beobachten (JUNGSMANN 2001)

Aus oben genannten Gründen wurde entschieden, für die Herstellung der Saatviren die CAM und die embryonalen Lebern zu entnehmen. Das CAM-Leber-Homogenat wurde geprüft, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Nach der Infizierung wurde das Virusantigen mittels IHC und Western blot nachgewiesen (s. Abb. 14, 15). Die RT-PCR mit anschließender REA (s. Abb. 17) (ZIERENBERG et al. 2001; RAUE et al. 2004) zeigte, dass das Virusgenom mit dem Ausgangsvirus identisch ist.

Da der Plaqueassay nur Informationen über die Infektiosität des Virus liefert, aber nicht über die Menge des Virusantigens, wurde auch die Western blot-Analyse durchgeführt. Die Western blot-Analyse kommt bei der Diagnostik der IBD in Frage (PEREIRA et al. 1998; MUND 1999; RODRIGUEZ-CHAVEZ et al. 2002). Bei der Analyse der 20%-igen Bursasuspension waren die Strukturproteine VP2 und VP3 deutlich zu sehen (s. Abb. 16 B, Bahn 1). Dagegen war bei der Analyse des 10%-igen CAM-Leber-Homogenats aus den Vermehrungsversuchen nur ein schwacher VP2-Band zu sehen (s. Abb. 15). Auch die Analyse des 10%-igen CAM-Leber-Homogenats des Stammes BD-3/99wt in der 2. Passage vom Jahr 2000, das als Ausgangsmaterial für die Vermehrung des Stammes BD-3/99wt benutzt wurde, hatte das gleiche Muster ergeben (s. Abb. 16, A, Bahn 2). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Bursa Fabricii als Hauptangriffsorgan *in vivo* eine größere Menge des Antigens produziert. Obwohl der Embryo für die Virusanzucht geeignet ist, ist die Menge des Virusantigens nicht so hoch wie in der Bursa Fabricii *in vivo*. IDE (1975) bemerkte, dass die Bursa empfindlicher für die Virusisolierung ist als der Embryo und in bestimmten Fällen eine Virusanzucht in Küken bessere Ergebnisse zeigt als im Ei. Besonders wichtig ist dies, wenn es um die Isolierung des Virus aus Feldausbrüchen geht.

VAN LOON und Mitarb. (2002) beschreiben ein „falsch negatives“ Ergebnis bei dem Virusnachweis im Western blot, da nachfolgende Tierversuche die Virusvermehrung bestätigten. Die Beobachtungen sowie die Ergebnisse aus anderen Studien zeigten nochmals, dass die Wirtssysteme eine große Rolle in der Virusvermehrung spielen.

4.3 Biologische Eigenschaften der Viren in den Zellkulturen

Ausgehend von der Biologie des IBDV bzw. dessen Vermehrung im embryonierten Ei wurden drei Zellkultursysteme auf Unterstützung des Viruswachstums geprüft. Diese Untersuchungen hatten auch das Ziel, die Vermehrung des cv-Stammes Cu-1 und des zellkulturadaptierten Stammes BD-3/99tc auf etablierten CAM-Epithelzellen so wie auf den HEL-Zellen und HEF-Kulturen zu untersuchen und damit die Frage zu beantworten, ob die ausgewählten Zellkulturen das Wachstum der Viren unterstützen und in welchem Umfang die Virusvermehrung abläuft. Da von NICK und Mitarb. (1976) von einer verzögerten Vermehrung des IBDV in epithelioiden Zellen berichtet wurden, wurden auch in dieser Arbeit unterschiedliche Vermehrungsmuster des IBDV erwartet.

Da die Biologie des Stammes BD-3/99tc noch nicht vollständig untersucht worden war, war auch von Interesse, diese Frage zu beantworten. Diese Voruntersuchungen dienten auch dem Ziel, geeignete Bedingungen für die eventuelle Vermehrung von hv-IBDV-Stämmen in Zellkulturen zu finden.

Die hv-IBDV-Stämme sind nicht in den bekannten Zellkultursystemen vermehrungsfähig, jedoch war es schon gelungen, mehrere Stämme mittels reverser Genetik an die Vermehrung in verschiedenen Zellkulturen zu adaptieren (MUNDT 1999; VAN LOON et al. 2002; LIM et al. 1999). Der Stamm BD-3/99tc ist ein mittels reverser Genetik hergestellter Stamm mit einem AS-Austausch in den Positionen Q253H und A284T (ISLAM et al. 2001; RAUE et al. 2004). Es ist schon allgemein bestätigt, dass die zellkulturadaptierten Stämme für Hühner apathogen sind, jedoch eine Immunität gegen das IBDV hervorrufen.

Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen sprechen dafür, dass die biologischen Eigenschaften der künstlich hergestellten Mutanten nicht immer gleich sind, obwohl die gleichen Veränderungen vorgenommen worden waren. Zum Beispiel zeigt der Stamm HK46 mit den Austauschen D279N und A284T höhere Titer in den HEF-Kulturen (LIM et al. 1999), als der Stamm UK661 mit den gleichen Veränderungen (VAN LOON et al. 2002). VAN LOON und Mitarb. (2002) zeigten auch, dass ein AS-Austausch in der Position A284T allein nur zu einer limitierten Kapazität der Replikation in den Zellkulturen führt. Das Zufügen des zweiten AS-Austauschs in der Position Q253H beschleunigt die Replikation des Virus in den Zellkulturen. Die gleichen Ergebnisse sind in der Arbeit von LIM und Mitarb. (1999) beschrieben, wobei der Mechanismus einer solchen Auswirkung nicht klar ist.

Zur Untersuchung der Replikationsgeschwindigkeit in den CAM-Epithelzellen, HEL-Zellen und in der HEF-Kultur wurden Wachstumskurven erstellt (s. Abb. 22). Die

Virusfreisetzung des Stammes Cu-1 war, wie erwartet wurde, in allen Zellkultursystemen im Vergleich zum Stamm BD-3/99tc schneller. Die Virusfreisetzung des Stammes BD-3/99tc war innerhalb eines Replikationszyklus wesentlich verzögert und erreichte ihren Höhepunkt erst nach 96 h p.i. Der Titerunterschied zwischen dem in den HEF-Kulturen und dem in den Epithelzellen bzw. CAM-Epithelzellen gewonnenen Virus betrug sowohl für den Stamm Cu-1 als auch für den Stamm BD-3/99tc 1,5-2 lg. KIBENGE und Mitarb. (1988b), SILVA und Mitarb. (2004) hatten verschiedene cv-IBDV-Stämme in Vero- und HEF-Zellen bzw. Vero- und CER-Zellen verglichen. Das Resultat zeigte, dass die gleichen Stämme in den verschiedenen Zellkultursystemen deutlich unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen.

Die unterschiedliche Wachstumskinetik zeigt, dass der virulente Stamm Cu-1 schneller wächst als der attenuierte zellkulturadaptierte Stamm BD-3/99tc (s. Abb. 22). Diese Ergebnisse zeigten nochmals, dass die Infektiosität streng mit der Replikationsgeschwindigkeit korreliert (NIEPER 1995). Ein verzögertes Wachstum des anderen attenuierten Stammes Cu-1M wurde von CURSIEFEN und Mitarb. (1979) beschrieben. Ebenso wurde eine lineare Korrelation zwischen der Reduktion des Virustiters und der verminderten Virulenz des Stammes Cu-1M von dieser Arbeitsgruppe festgestellt. Auch ist eine verzögerte Vermehrung in den CAM-Epithelzellen und in den HEL-Zellen zu sehen (s. Abb. 22 A, C). Diese Ergebnisse stimmen mit den Mitteilungen von NICK und Mitarb. (1976) überein.

Die Ergebnisse, die nach der Analyse der Wachstumskinetik erreicht wurden, werden auch durch die FACS-Analyse (s. Abb. 19) der antigenpositiven Zellen und des IIFT (s. Abb. 18) bestätigt. Die zellgebundenen Viren wurden 24 h p.i. mittels FACS untersucht. Am meisten wurde das Cu-1-Virusantigen in allen Zellsystemen ermittelt.

Der Western blot zeigte auch, dass die nicht an CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen adaptierten Viren 24 h p.i. kein positives Signal aufwiesen (s. Abb. 20 A). Das bestätigte sich auch in der FACS-Analyse und zeigte die Notwendigkeit, noch weitere Passagen durchzuführen. Tatsächlich wurden die Virusproteine nach drei aufeinander folgenden Passagen in CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen im Western blot nachgewiesen (s. Abb. 20 B). Die Menge des gewonnenen Virusantigens blieb trotzdem gering. Dies liegt vermutlich daran, dass die Vermehrungskapazität des Virus von der Art der Zellkulturen abhängt (s. Abb. 22). Dass die primären Zellkulturen nur eine kleine Virusernte ermöglichen, ist bei LUKERT und Mitarb. (1975) erwähnt.

Die Frage der CPE-Bildung geht mit folgenden Beobachtungen einher: In den HEF-Kulturen ist die Virusvermehrung immer mit der vollständigen Zerstörung des Zellrasens verbunden (s. Abb. 21 B, C). Bei der Beimpfung von CAM-Epithelzellen und Hepatozyten ist diese Art des CPE nicht deutlich zu sehen, da der Zellrasen erhalten bleibt (s. Abb. 21 E, F, H, I).

Der Unterschied zwischen schein-infizierten und infizierten Proben liegt nur in der Zahl der nekrotischen Zellen, die im Kulturmedium zu finden sind. Eigenen Beobachtungen zufolge sind die Epithelzellen auch unter *in vitro*-Bedingungen sehr stark miteinander verbunden, wodurch es nicht zur Zerstörung des Zellrasens kommt. Es wird vermutet, dass die Epithelzellen auch unter *in vitro*-Bedingungen eigene Schutz-Eigenschaften besitzen und dadurch eine verminderte Empfindlichkeit gegen die Infektion aufweisen.

Auch HOWIE und THORSEN (1981) hatten in ihrer Arbeit keinen deutlichen CPE an den HEL-Kulturen beobachtet.

Die Vermehrung sowohl von Cu-1 als auch von BD-3/99tc zeigt deutlich, dass die Vermehrbarkeit eines Virus von den ausgewählten Zellkultursystemen abhängt. Andererseits zeigt der Stamm BD-3/99tc, dass die AS-Austausche nicht nur die Anpassung an die Zellkulturen bestimmen, sondern auch viele biologischen Eigenschaften des Virus ändern.

4.4 Vermehrung der hv-IBDV-Stämme in HEF-Kulturen, CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen

Die Idee, die als Grundlage für diese Arbeit vorgeschlagen wurde, war, die hv-IBDV-Stämme *in vitro* zu züchten, ohne die Virulenz des Virus zu verlieren. Da nach bisherigen Berichten die Zellkulturadaptation offenbar immer mit der Attenuierung des Virus verbunden ist (HASSAN u. SAIF, 1996; MUNDT 1999, LIM et al. 1999, VAN LOON et al. 1999), war es von Interesse, ausgehend von den biologischen Eigenschaften des Virus *in ovo* ein solches Zellkultursystem zu etablieren, das das Viruswachstum unterstützt und weiterhin die Erforschung der hv-Stämme von IBDV *in vitro* ermöglicht. Die Bearbeitung dieser Fragestellung sollte zudem sowohl die Isolation von Feldstämmen als auch die Virusdiagnostik erleichtern und für die genetischen Studien nützlich sein.

Im Rahmen dieses Arbeitsabschnitts wurden zwei Stämme von hv-IBDV (BD-3/99wt und BD-3/99mc) auf ihre Vermehrbarkeit in den CAM-Epithelzellen und in den HEL-Zellen untersucht. Alle Untersuchungen wurden mit den klassischen virologischen Methoden durchgeführt. Das Virusantigen wurde mittels IIFT, Western blot und FACS analysiert. Da die Vermehrung der hv-IBDV-Stämme immer mit einem AS-Austausch verbunden ist entweder in Bereichen D279N-A284T oder Q253H-A284T, (LIM et al. 1999; VAN LOON et al. 1999; MUNDT 1999), war geplant, bei positiven Ergebnissen diese Veränderungen nachzuweisen oder auszuschließen.

In diesem Versuch wurde die Virus-RNA nach jeder Passage aus dem Zellpellet extrahiert, mittels RT-PCR in c-DNA umgeschrieben und mittels REA einem Stamm

angeordnet. Nach den ersten Passagen war die Virus-RNA-Isolation in allen Versuchsreihen positiv (s. Abb. 26 A).

Um die Menge der exprimierten Virusproteine zu schätzen, wurde ein Western blot durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass nur BD-3/99tc ein schwaches Signal in den CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen zeigt (s. Abb. 23). Ausgehend von dem Titer des Virus (ca. $2,75 \times 10^3$ PBE/ml, s. Tab. 4) und der Empfindlichkeit der CAM- und HEL-Zellkultur wurden diese Ergebnisse erwartet (s. Abschnitt 3.3). In der HEF-Kultur war das Proteinmuster zwar schwach, aber deutlich zu sehen (s. Abb. 23). Die beiden hv-Stämme waren nach der ersten Passage im Western blot negativ.

Auch der IIFT zeigt ein positives Signal nur in den Kulturen, die mit dem BD-3/99tc infiziert wurden (s. Abb. 24). Um die „falsch-negativen“ Ergebnisse (im diesem Versuch die sichtbaren negativen Ergebnisse im IIFT, trotz eventueller Virusvermehrung), die nach der ersten Passage sichtbar waren, auszuschließen, wurde nochmals die FACS-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass weder die CAM-Epithelzellen, noch die Hepatozyten mit den hv-Stämmen BD-3/99wt und BD-3/99mc infiziert wurden. Eine Infektion der Zellen mit dem Stamm BD-3/99tc wurde in allen Zellsystemen nachgewiesen (s. Abb. 25 D).

Die weiteren zwei Passagen haben die Vermutung, dass die Virus-RNA, die nach der 1. Passage nachgewiesen wurde, vom virushaltigen Ausgangsmaterial stammt, unterstützt (s. Abb. 27). Im Laufe dieses Versuches war es demnach nicht zu der meist mit einer Attenuierung verbundenen Anpassung des Virus an die Zellkultur gekommen. Dagegen sieht man deutlich, dass sich der Stamm BD-3/99tc in den Zellkulturen vermehrt.

Alle Versuche wurden drei Mal mit jeweils drei Passagen wiederholt, und in keiner Versuchsreihe konnte die RNA der hv-IBDV Stämme in den HEF-Zellen, HEL-Zellen und in den CAM-Epithelzellen nachgewiesen werden. Damit stellen auch weiterhin nur die Bursa Fabricii und die CAM ein geeignetes Expressionssystem für die nicht zellkulturadaptierten hv-IBDV-Stämme dar.

Wenn man die erhaltenen Ergebnisse näher analysiert, um die Ursache dieses negativen Resultats zu erklären, könnte folgende Diskussion eröffnet werden:

NIEPER (1995) zeigte, dass unterschiedliche Rezeptoren auf der Zelloberfläche von HEF und Lymphozyten aus Bursa, Milz und Tymus für die Unterschiede bei den Bindungsraten der Viren beider Serotypen verantwortlich sein könnten. Weiterhin wird postuliert, dass die HEF sowohl Serotyp-übergreifende als auch Serotyp-spezifische Bindungsstellen für beiden Serotypen des IBDV haben. Alle untersuchten Lymphozyten haben ebenfalls eine für beide Serotypen gemeinsame Bindungsstelle und zusätzlich eine Bindungsstelle, die spezifisch Serotyp 1 bindet, jedoch bei den untersuchten Lymphozyten aus Bursa, Milz und Thymus nicht

vorhanden ist. Serotyp-spezifische Unterschiede bei der Bindung sind bei *Reoviridae* (AMBLER u. MACKAY 1991; VERDIN et al. 1989) und dem zu den *Picornaviridae* gehörenden Theilerschen Virus beschrieben worden (FOTIADIS et al. 1991). In beiden Fällen sind unterschiedliche Bindungsstellen beschrieben, die auf verschiedene Rezeptoren hindeuten.

Ausgehend von den hier beschriebenen Ergebnissen lässt sich vermuten, dass sowohl *in vivo* als auch *in ovo* eine Bindungsstelle existiert, die spezifisch für die hv-Stämme von IBDV sein könnte. Ein homologer Rezeptor, der nur hv-IBDV an der Zelloberfläche bindet, führt zu einem schnelleren Erreichen des Bindungsgleichgewichts und dadurch zur schnellen Replikationsgeschwindigkeit. Das könnte eine der Ursachen sein, die die Ausbrüche der hv-IBDV-Stämme in den geimpften Beständen erklärt. HAFEZ und Mitarb. (2003) hatten nach einem Ausbruch nach 36 Tagen post Vakzination sowohl im Bursahomogenat als auch im embryonierten Hühnerei einen hv-IBDV-Stamm und einen Vakzine-Stamm nachgewiesen. Die Zellrezeptoren, die *in ovo* und *in vitro* auf der CAM und den HEL-Zellen vorhanden sind, könnten gewisse Unterschiede aufweisen (z. B. die Zahl und die Spezifität der Rezeptoren). Diese Unterschiede könnten eine essentielle Rolle bei der Virus-Zell-Interaktion spielen.

Vermutlich wird die Bindungsfähigkeit der Zellen durch die enzymatische Behandlung beeinträchtigt. Da die Proteinstrukturen auf HEF für die Bindung von IBDV verantwortlich sind, könnte die enzymatische Behandlung zu einer verminderten Bindung des Virus führen (NIPER 1995). Die Proteinnatur zahlreicher Virusrezeptoren ist schon nachgewiesen worden, beispielsweise für das Virus der lymphozytären Choriomeningitis (BORROW u. OLDSTONE 1992), SV40 (CLAYSON u. COMPANS 1989), das Moloney Leukämie-Virus (JOHNSON u. ROSNER 1986), das Sindbis-Virus (UBOL u. GRIFFIN 1991) und das B-lymphotrope Papovavirus (HAUN et al. 1993). Darüber hinaus könnten die vermutlich spezifischen Bindungsstellen, die *in ovo* vorhanden sind, durch die enzymatische Behandlung der Zellsuspension zerstört werden oder deren Zahl so zurückgehen, dass keine Virusbindung mehr möglich ist.

Die verzögerte Vermehrung der Stämme Cu-1 und BD-3/99tc sowohl in den CAM-Epithelzellen als auch in den HEL- und HEF-Zellen (s. Abb.22) könnte auch von der Abwesenheit spezifischer Rezeptoren beeinflusst worden sein. Die HEF-Zellen haben *in vitro* für die Serotypen 1 und 2 spezifische Bindungsstellen. Die Anpassung der hv-IBDV an die Zellkulturen ist immer mit einem AS-Austausch verbunden. Dieser Austausch macht die Virus-Zell-Interaktion möglich, d.h., die Zellen erkennen die Virusrezeptoren, die für die Bindung der zellkulturadaptierten Stämme verantwortlich sind. Dies ist aber nicht der Fall, wenn es um ein wt-Virus geht, das originale Kapsidproteine besitzt.

Neben dem Zellrezeptor kann auch das auf Virusseite an der Virus-Zell-Interaktion beteiligte Protein eine Bedeutung für den Zell- und Gewebetropismus eines Virus haben. Als virale Anheftungsproteine (VAP) kommen bei IBDV die beiden das Kapsid bildenden Strukturproteine in Frage: VP2 mit den Domänen für die Neutralisation und/oder VP3. Hinweise dafür, dass VP3 an der Virus-Zellbindung beteiligt sein könnte, lieferten REDDY et al. (1992), die mit einem VP3-spezifischen mAk die Anheftung von IBDV verhindern konnten. Die geringfügige neutralisierende Aktivität des Antikörpers wurde mit der Inhibition der Virusbindung erklärt, die nur stattfinden kann, wenn hohe Konzentrationen des Antikörpers zur Verfügung stehen. Ein weiterer Hinweis auf VP3 als VAP von IBDV lieferte eine von MÜLLER (1987) beschriebene Mutante von Cu-1 mit einem verkleinerten VP3. Sie wies eine verminderte Virulenz auf, die auf einer verzögerten Replikation beruhte.

Demgegenüber verhinderten gegen VP2 gerichtete neutralisierende mAk die Bindung von IBDV nicht. Jedoch konnten REDDY et al. (1992) auch 4 h nach der Virusabsorption noch neutralisierende Aktivitäten durch diese Antikörper nachweisen. Daraus lässt sich schlußfolgern, dass das Segment A für die Infektiosität des Virus verantwortlich ist, also die Wechselwirkung des Virus mit der Zelle. Das ist übereinstimmend mit der Tatsache, dass einige Aminosäuren in der variablen Region des VP2 für das Wachstum in der Zellkultur verantwortlich sind (LIM et al. 1999; MUNDT, 1999; RAUE et al. 2004; WANG et al. 2004). Die Ergebnisse, die von ZIERENBERG (2001) veröffentlicht wurden, zeigten, dass die Passage an HEF nur bei den Viren möglich war, die das Segment A der zellkulturadaptierten Stämme Cu-1 oder 23/82 besaßen. Trotzdem vermuten BOOT und Mitarb. (2000), dass das VP2 nicht allein ausschlaggebend für die erhöhte Virulenz ist. WANG et al. (2007) zeigte, dass nach Eipassagen und der Attenuierung des Gx-Stammes bis zur 9. Zellkulturpassage die Genomabschnitte VP3 und VP5 unverändert bleiben, jedoch ab der 9. Passage ein Austausch in verschiedenen Aminosäurenpositionen nachgewiesen werden konnte.

Eine andere Vermutung ist, dass es unter *in vivo*- und *in ovo*-Bedingungen einige Faktoren gibt, die eine Bindung des wt-Virus ermöglichen und die Krankheitserscheinungen hervorrufen. MÜLLER (1986a), BURKHARDT und MÜLLER (1987) hatten festgestellt, dass das Mikromilieu der BF einen starken Einfluss auf die Virusvermehrung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* hat. Obwohl in hier vorgestellten Untersuchungen die Etablierung der passenden Bedingungen für die Zellen *in vitro* eine der Grundaufgaben war, ist es nicht gelungen, *in ovo*-Bedingungen voll identisch herzustellen. Andererseits stellen die *in vitro* gezüchteten Zellen ein einzigartiges Biosystem dar, dessen Lebenskriterien mit dem Organismus nicht vergleichbar sind.

Die Untersuchungen, die von NIEPER (1995) beschrieben wurden, zeigten die Anpassungsmechanismen der zelladaptierten Stämme Cu-1 und 23/82 *in vitro*. Eine Antwort auf die Frage, wie der Anpassungsmechanismus der hv-Stämme ist und welche Faktoren eine wichtige Rolle spielen, ist noch nicht gegeben worden.

Wir spekulieren, dass die Ursache einer bis heute nicht gelungenen Anzüchtung der hv-IBDV *in vitro* an den Zellkulturen liegen könnte. Da alle bekannten Zellkulturen, sowohl die homologen (z. B. HEF-Kulturen, die HEL-Zellen, die CAM-Epithelzellen und die CER-Zellen) als auch die heterologen (z. B. die Säugerzelllinien wie Vero, BGM-70, MA-104) keine Replikation der hv-IBDV-Stämme unterstützen, könnte man annehmen, dass die Zellen *in vitro* keine passenden Rezeptoren besitzen, die das wt-Virus binden. Vermutlich könnten weitere Untersuchungen die Frage beantworten, wie die Virus-Zell-Interaktion des hv-IBDV *in ovo* und *in vivo* auf der Zellebene funktioniert, und welche Zellrezeptoren an diesem Prozess beteiligt sind.

Weiter schließen wir nicht aus, dass die Zusammensetzung des Mikromilieus der Bursa und des Eis auch eine gewisse Rolle bei der Virusvermehrung spielen. Die Beantwortung dieser Frage könnte hilfreich sein und ganz neue Erkenntnisse für die Verbesserung der Anzuchtbedingungen des IBDV in Zellkulturen liefern.

Ein näheres Studium dieser Fragen könnte dann die Möglichkeit eröffnen, hv-Stämme *in vitro* zu züchten, ohne die Virulenz des Virus zu verlieren.

5 Zusammenfassung

Zenkina, Olga

Etablierung eines Zellkultursystems zur Isolierung hochvirulenter Stämme des Virus der infektiösen Bursitis (IBDV)

Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Januar 2009

Schlüsselworte: Chorioallantoismembran-Zellen, Leberzellen, Zellkultur, hv-IBDV

102 Seiten, 27 Abbildungen, 5 Tabellen, 2 Schemas, 285 Literaturangaben

Die Infektiöse Bursitis ist eine Virusinfektion 3-6 Wochen alter Hühner, die bei Überlebenden mit einer schweren Immunsuppression verbunden ist. Sie verursacht weltweit große wirtschaftliche Schäden. Seit dem Auftreten hoch virulenter (hv) Stämme des Virus der infektiösen Bursitis (infectious bursal disease virus, IBDV) Ende der 80-er Jahre blieben viele Fragen zu den biologischen Eigenschaften dieser Virusstämme und einer effektiven Bekämpfung der von ihnen ausgelösten Erkrankung ungeklärt. Unter anderem gelingt es zumeist nicht, hv-Stämme in der Zellkultur zu isolieren. Von besonderem Interesse ist es daher, solche Zellkulturen zu erhalten, die es erlauben, hv-Stämme *in vitro* zu züchten, ohne dass zuvor deren Genom verändert werden muss. Ziel dieser Arbeit war es daher, geeignete Zellkulturen für die Vermehrung von hv-IBDV-Stämmen zu etablieren und dann einige von deren biologischen Eigenschaften näher zu untersuchen.

Recherchen in der Literatur und eigene Voruntersuchungen zeigten, dass sowohl Epithelzellen der Chorioallantoismembran (CAM-Epithelzellen) als auch Hühnerembryo-Leber-Zellen (HEL-Zellen) die Vermehrung von IBDV ermöglichen und für virologische Untersuchungen geeignet sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Bedingungen der enzymatischen Isolierung (Kollagenase/Hyaluronidase; Trypsin) von Epithelzellen der Chorioallantoismembran befruchteter und zehn Tage bebrüteter Hühnereier optimiert, danach erfolgte die Optimierung der Zusammensetzung des Wachstumsmediums („Ham's F12-Komplettmedium“). Nach Bebrütung (48 h, 38°C, 5% CO₂) wurden die erhaltenen CAM-Zellen durch den serologischen Nachweis von Cytokeratin 8 mittels eines monoklonalen Antikörpers durch FACS-Analyse, Western blot und indirekter Immunfluoreszenz als Epithelzellen identifiziert. Es zeigte sich, dass durch die Optimierung der Isolierungs- und Kulturbedingungen weitgehend reine Epithelzell-Kulturen erhalten werden konnten und somit eine wesentliche Voraussetzung zur Durchführung der geplanten Studie geschaffen war. Als eine zweite, für die Vermehrung der hv-Stämme möglicherweise geeignete Zellkultur wurden HEL-Zellen mittels Standardverfahren isoliert und kultiviert. Als Wachstumsmedium wurde hier William's E-Medium, ergänzt durch verschiedene Zusätze, verwendet.

Als Testviren wurden der hv-Stamm BD-3/99wt, sein aus anderen Untersuchungen zur Verfügung stehendes molekular kloniertes Derivat BD-3/99mc sowie die zellkulturadaptierten Stämme Cu-1 und BD-3/99tc mit einbezogen. Letzterer ist ein durch Aminosäureaustausche in den Positionen Q253H-A284T des Strukturproteins VP2 an Zellkulturen adaptierter Stamm und avirulent für Hühner. Da keine Angaben zu den biologischen Eigenschaften des Stammes BD-3/99tc vorlagen, sollte dieser *in ovo* und *in vitro* näher untersucht werden.

Zur Beschaffung ausreichender Mengen an infektiösem Ausgangsmaterial wurden die oben genannten IBDV-Stämme in embryonierte, 11 Tage bebrütete Hühnereier inokuliert und diese 72 Stunden bei 38°C weiter bebrütet. Die Virusvermehrung wurde mittels IBDV-spezifischer RT-PCR und REA, Western blot und Virustitration (Brutei, Plaquetest in Zellkulturen aus Hühnerembryofibroblasten [HEF]) nachgewiesen. In den Zellen der CAM und der Leber wurde die Anwesenheit IBDV-spezifischer Antigene auch mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser *in ovo*-Infektionsversuche zeigten, dass sowohl die CAM-Epithelzellen als auch die HEL-Zellen die Vermehrung der genannten hv-IBDV-Stämme ermöglichen. Damit konnte erwartet werden, dass auch die etablierten Zellkultursysteme zu deren Vermehrung *in vitro* geeignet sind.

Bezüglich ihrer Fähigkeit zur Virusvermehrung *in vitro* wurden CAM-Epithelzellen und HEL-Zellen gleich behandelt und untersucht. Nach Infektion (60 min, 38°C) des ca. 80% konfluenten Zellrasens wurde Erhaltungsmedium zugegeben und die Kulturen je nach Virusstamm entweder 48 h (Cu-1) oder 96 h (BD-3/wt; BD-3/99tc) bei 38°C in einer 5% CO₂ - Atmosphäre inkubiert. Alle Untersuchungen wurden dreimal wiederholt. Die Vermehrung des hv-IBDV-Stammes BD-3/99wt und des molekular klonierten Stammes BD-3/99mc in den genannten Zellkulturen wurde mittels IIFT, Western blot, FACS-Analyse und RT-PCR mit anschließender REA untersucht. Die FACS-Analyse zeigte, dass eine Vermehrung dieser Stämme weder in den CAM-Zellen noch in den HEL-Zellen erfolgte. RT-PCR-Untersuchungen ließen erkennen, dass die nach der ersten Passage vorhandene Virus-RNA offenbar aus dem Ausgangsmaterial stammte, da nach drei aufeinander folgenden Passagen keine Virus-RNA mehr vorhanden war. Dagegen zeigte der mittels reverser Genetik an Zellkulturen adaptierte Stamm BD-3/99tc wie auch der in einige Vergleichsuntersuchungen mit einbezogene Stamm Cu-1 als Positivkontrollen in beiden Zellarten eine deutliche Virusvermehrung.

Als Ursache der fehlenden Vermehrungsfähigkeit *in vitro* ist denkbar, dass (i) die CAM-Epithelzellen und die HEL-Zellen keine Bindungsstellen für hv-IBDV-Stämme besitzen; (ii) die Zusammensetzung des Mikromilieus der Bursa und des Eies auch eine gewisse Rolle für deren Befähigung zu Virusvermehrung spielen; (iii) die reduzierte Teilungsfähigkeit dieser Zellen *in vitro* nicht die notwendigen Voraussetzungen für eine Virusreplikation schafft. Die Klärung dieser Fragen könnte für die Verbesserung der Anzuchtbedingungen für hv-IBDV-Stämme in der Zellkultur hilfreich sein.

6 Summary

Zenkina, Olga

Establishment of a cell culture system for isolation of highly virulent infectious bursal disease virus (IBDV)

Institute for Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in January 2009

Key words: chorioallantoic membrane, liver cells, cell culture, hvIBDV

102 pages, 27 figures, 5 tables, 2 schemes, 285 references

Infectious bursal disease is a viral disease affecting 3 to 6-weeks old chickens. Surviving birds are immunosuppressed resulting in huge economic loss due to poor performance. Many biological properties as well as the effective control of the disease remained unknown particularly after the emergence of highly virulent IBDV (hvIBDV) strains at the end of 1980s. Amongst others, there is no cell culture system known for the propagation IBDV field strains which would allow investigating these viruses *in vitro* without prior changes in their viral genome. Therefore, the objective of this work was to develop and establish a cell culture system for the propagation of hvIBDV field strains and to analyse some of their biological properties.

A literature search and own findings revealed that the propagation and investigation of IBDV is possible in epithelial cells of the chorioallantoic membrane (CAM) as well as chicken embryo liver (CEL) cells. The conditions of the enzymatic isolation (collagenase/hyaluronidase; trypsin) of CAM cells from ten days old fertilised eggs was optimised in a first step followed by the optimisation of the growth medium („Ham’s F12-Komplettmedium“). After incubation (48 h, 38°C, 5% CO₂) the CAM cells were identified as epithelial cells by serological detection of cytokeratine 8 using FACS analysis and a monoclonal antibody, Western blot and indirect immunofluorescence test (IIFT). It was demonstrated that highly purified epithelial cell cultures were generated by the optimisation of the isolation and cultivation conditions. This was a key achievement for the success of the planned studies. CEL cells identified as a second option for the isolation of hvIBDV strains were isolated and cultivated following standard protocols. William’s E-Medium with various additives was used as the growth medium.

The hvIBDV strains BD-3/99wt and its molecularly cloned derivate BD-3/99mc were selected as representatives for this study. In addition the cell culture-adapted strains Cu-1 and BD-3/99tc were included as well. BD-3/99tc is adapted to cell culture by the exchange of amino acids at positions Q253H and A284T and non-virulent for chicken. As no information on the

biological characteristics of this strain was available, it was a secondary objective of this study to investigate BD-3/99tc *in ovo* and *in vitro*.

The investigational IBDV strains were inoculated in 11 days old embryonated chicken eggs and harvest after 72 h at 38°C to get sufficient amounts of infectious material. The virus isolation was confirmed by IBDV-specific RT-PCR and REA, Western blot and virus titration (eggs, plaque tests in chicken embryo fibroblasts [CEF]). The presence of IBDV-specific antigens was also detected in CAM and CEL cells by immunochemistry. The results of this *in ovo* infection study showed that CAM cells as well as CEL cells are able to propagate hvIBDV strains. It could be expected that the established cell culture should be able to propagate these strains *in vitro* as well.

CAM and CEL cells were treated the same and investigated in parallel for the *in vitro* virus propagation studies. After infection (60 min, 38°C) of the approximately 80% confluent cell monolayers the medium was added and the cell cultures were incubated depending on the virus strain 48 h (Cu-1) or 96 h (BD-3/wt; BD-3/99tc) at 38°C and 5% CO₂. All investigations were performed in triplicate. The propagations of the hvIBDV strain BD-3/99wt and the molecularly cloned strain BD-3/99mc were analysed in the two cell culture systems by IIFT, Western blot, FACS analysis and RT-PCR followed by REA. The FACS analysis showed that none of the strains were able to propagate in the CAM or CEL cell cultures. The RT-PCR revealed that the detected viral RNA of the first passage came from the starting material as no virus RNA was detectable after three passages. In contrast, the molecularly cell culture adapted strain BD-3/99tc as well as the control strain Cu-1 showed good virus propagation in both cell culture systems.

The reasons for the lack of virus propagation *in vitro* could be that (i) the CAM and CEL miss a receptor for hvIBDV strains; (ii) the micromilieu of the bursa of Fabricius and of the egg plays a role in virus propagation; (iii) the reduced growth rate of these cells *in vitro* does not provide the necessary conditions for the virus propagation. The answers to these questions would bring the development of an *in vitro* cell culture system for hvIBDV field strains a further step forward.

7 **Literaturverzeichnis**

Abdel-Alim G, Awaad MH, Saif YM. Characterization of Egyptian field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 2003;47:1452-7.

Abdel-Alim GA, Saif YM. Detection and persistence of infectious bursal disease virus in specific-pathogen-free and commercial broiler chickens. *Avian Dis.* 2001a;45:646-54.

Abdel-Alim GA, Saif YM. Pathogenicity of cell culture-derived and bursa-derived infectious bursal disease viruses in specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.* 2001b;45:844-82.

Abdel-Alim GA, Saif YM. Pathogenicity of embryo-adapted serotype 2 OH strain of infectious bursal disease virus in chickens and turkeys. *Avian Dis.* 2002;46:1001-6.

Akins RE, Tuan RS. Transepithelial calcium transport in the chick chorioallantoic membrane. I. Isolation and characterization of chorionic ectoderm cells. *J Cell Sci.* 1993;105:369-79.

Allan WH, Faragher JT, Cullen GA. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. *Vet Rec.* 1972;90:511-2.

Almeida JD, Morris R. Antigenetically related viruses associated with infectious bursal disease. *J Gen Virol.* 1973;20:369-75.

Ambler L, Mackay M. Reovirus 1 and 3 bind and internalise at the apical surface of intestinal epithelial cells. *Virol.* 1991;184:162-9.

Ang LPK, Tan DTH, Beuerman RW, Lavker RM. Development of conjunctival epithelial equivalent with improved proliferative properties using a multistep serum-free culture system. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:1789-95.

Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J. Vascularisation of normal und neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantoic. Role of host and pre-existing graft blut vessels. *Am J Pathol.* 1975;79:597.

Azad AA, Barrett SA, Fahey KJ. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Viol.* 1985;143:35-44.

Azad AA, Jagadish MN, Brown MA, Hudson PJ. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Viol.* 1987;161:145-52.

Balamurugan V, Kataria JM. Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral disease of chicken-current status. *Vet Res Commun.* 2006;30:541-66.

Banerjee SS, Harris M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology.* 2003;6:387-402.

Bashor MM. Dispersion und disruption of tissues. *Methods Enzymol.* 1979;LVIII:119-31.

Bayliss CD, Spies U, Shaw K, Peters RW, Papageorgiou A, Müller H, Boursnell ME. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol.* 1990;71:1303-12.

Becht H. Infectious bursal disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1980;90:107-21.

Becht H, Müller H, Müller HK. Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol.* 1988;69:631-40.

Benton WJ, Cover MS, Rosenberger JK. Physico-chemical properties of the infectious bursal agent (IBA) of chickens. *Avian Dis.* 1967;11:430-8.

Bernkopf FM. Cultivation of influenza virus in the chorioallantoic membrane of deembryonated eggs. *Proc Soc Exp Biol. (NJ)* 1949;72:680-5.

Bernstein F. Analyse und Vergleich der Genome pathogener und apathogener Stämme des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) [Dissertation med. vet]. Gießen: Univ. Gießen; 1994.

Bertolero F, Kaighn ME, Gonda MA, Saffiotti U. Mouse epidermal keratinocytes. Clonal proliferation and response to hormones and growth factors in serum-free medium. *Exp Cell Res.* 1984;155:64-80.

Bertolero F, Kaighn ME, Camalier RF, Saffiotti U. Effects of serum and serum-derived factors on growth and differentiation of mouse keratinocytes. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1986;22(7):423-8.

Boot HJ, Ter Huurne AA, Hoekman AJ, Peeters BP, Gielkens AL. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J Virol.* 2000;74:6701-11.

Borges J, Tegtmeier FT, Torio-Padron N, Müller MC, Stark GB. Untersuchung der Angiogenese im Tissue Engineering das Zylindermodell auf der Chorioallantoismembran. *Der Chirurg.* Springer-Verlag; 2003.

Borrow P, Oldstone MBA. Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus. *J Virol.* 1992;66:7270-81.

Bottenstein J, Hayashi I, Hutchings S, Masui H, Mother J, McClure DB, Has S, Razzing A, Sato G, Serrero G, Wolfe R, Wu R. The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. *Methods Enzymol.* 1979;LVIII:94-109.

Boyse ST, Ham RG. Calcium- regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol.* 1983;81:33-40.

Brand CD. Inclusion body formation with Newcastle disease and mumps viruses in cultures of chick embryo cells. *Virol.* 1958;5:177.

Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA, Vakharia VN. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol.* 2001;75:11974-82.

Breitkreutz D, Bohnert A, Herzmann E, Bowden PE, Boukamp P, Fusenig NE. Differentiation specific functions in cultured and transplanted mouse keratinocytes: environmental influences on ultrastructure and keratin expression. *Differentiation.* 1984;26:154-9.

Brown F. The classification and nomenclature of viruses, summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai. *Intervirology.* 1986;25:141-3.

Brown MD, Green P, Skinner MA. VP2 sequences of recent 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J Gen Virol.* 1994;75:675-80.

Brunet JP, Jourdan N, Cotte-Laffitte J, Linxe C, Geniteau-Legendre, Servin A, Quero AM. Rotavirus infection induced cytoskeleton disorganisation in human intestinal epithelial cells: implication of an increase in intracellular calcium concentration. *J Virol.* 2000;74:10801-6.

Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330(1):142-50.

Burkhardt E, Müller H. Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch Virol.* 1987;94:297-303.

Cardoso TC, Rahal P, Pilz D, Teixeira MCB, Arns CW. Replication of classical infectious bursal disease virus in the chicken embryo related cell line. *Avian Pathol.* 2000;29:213-317.

Campbell G. Investigation into evidence of exposure to infectious bursal disease virus and infectious anaemia virus in wild birds in Ireland. 2. International Symposium on infectious bursal disease und chicken infectious anaemia, Rauischholzhausen. 2001;230-55.

Chai YF, Christensen NH, Wilks CR, Meers J. Characterization of New Zealand isolates of infectious bursal disease virus. *Arch Virol.* 2001;146:1571-80.

Chen HY, Zhou Q, Zhang MF, Giambrone JJ. Sequence analysis of the VP2 hypervariable region of nine infectious bursal disease virus isolates from mainland China. *Avian Dis.* 1998;42:762-9.

Chettle NJ, Eddy RK, Wyeth PJ. The isolation of infectious bursal disease virus from turkeys in England. *Br Vet J.* 1985;141:141-5.

Cho Y, Edgar SA. Characterization of the infectious bursal agent. *Poultry Sci.* 1969;48:2102-9.

Clayson ET, Compans RW. Characterization of simian virus 40 receptor moieties on the surface of Vero C10088 cells. *J Virol.* 1989;63:1095-100.

Clayton H, Titley I, Vivanco MdM. Growth und differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland. *Exp Cell Res.* 2004;297:444-60.

Coleman JR, Terepka AR. Fine structural changes associated with the onset of calcium, sodium und water transport by the chick chorioallantoic membrane. *J Membr Biol.* 1972;7:121-7.

Cosgrove AS. An apparently new disease of chickens avian nephrosis. *Avian Dis.* 1962;6:385-9.

Cottral GE. (Hrsg) Manual of standardised methods for veterinary microbiology. Comstock Cornell University Press, London, 1978.

Crnic AP, Sakar D, Pompe-Gotal J, Bidin Z, Lojkic I, Cajavec S. Effects of tow infectious bursal disease vaccine virus strains on hepatic microsomal enzyme activities in chickens. *Acta Vet Hung.* 2006;54(2):281-93.

Cursiefen D. Wirtszellspezifität des Virus der infektiösen Bursitis. *Fortschritte der Veterinärmedizin.* 13. Kongressbericht, Heft 1980;30:194-6.

Cursiefen D, Becht H. In vitro cultivation of cells from the chorioallantoic membrane of chick embryos. *Med Mikrobiol Immunol. (Berl)*, 1975;161:3-10.

Cursiefen D, Käufer I, Becht H. Loss of virulence in a small plaque mutant of the infectious bursal disease virus. *Arch Virol.* 1979; 59:39-46.

Daher A, de Boer WI, Le Frere-Belda, Kheuang L, Abbou CC, Radvanyi F, Jaurand MC, Thiery JP, de Medina SGD, Chopin DK. Growth, differentiation and senescence of normal human urothelium in an organ-like culture. *Eur Urol.* 2004;45:799-805.

DeFouw DO. Structural heterogeneity within the pulmonary microcirculation of the normal rat. *Anat Rec.* 1988;221:645-54.

Dlugosz AA. Isolation and utilisation of epidermal keratinocytes for oncogene research. *Methods Enzymol.* 1995;254:3-20.

Dobos P, Hill BJ, Hallett R, Kells DT, Becht H, Teninges D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol.* 1979;32:593-605.

Dormitorio TV, Giambrone JJ, Duck LW. Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates. *Avian Dis.* 1997;41:36-44.

Du Boulay CE. Immunohistochemistry of soft tissue tumours: a review. *J Pathol.* 1985;146:77-94.

Dulbecco R, Freeman G. Plaque-Proliferation by the polyoma virus. *Virol.* 1959;8:396-7.

Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med.* 1954;99:167-74.

Dunn BE. Active calcium transport in the chick chorioallantoic membrane requires interaction with the shell membranes and/or shell calcium. *Dev. Biol.* 1981;88:259-68.

Edgar SA, Cho Y. Avian nephrosis (Gumboro disease) and its control by immunisation. Poultry Sci. 1965;44:1366.

Eterradossi N. Progress in the Diagnosis and Prophylaxis of Infectious Bursal Disease in Poultry. Comprehensive reports of technical items presented to the International Committee or to regional Commissions. Paris: OIE. 1995;75-82.

Eterradossi N, Arnould C, Tekaiia F, Toquin D, Le Coq H, Rivallan G. Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. Avian Pathol. 1999;28:36-46.

Eterradossi N, Arnould C, Toquin D, Rivallan G. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. Arch Virol. 1998;143:1627-36.

Eterradossi N, Rivallan G, Toquin D, Guittet M. Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. Arch Virol. 1997;143:2079-87.

Faragher JT. Infectious bursal disease of chickens. Vet Bull. 1972;42:361-9.

Faragher JT, Allan WH, Wyeth PJ. Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. Vet Rec. 1974;95:385-8.

Fazekas St. Groth, White S. Comparison of infectivity of influenza viruses in two host systems. The allantois of infected eggs and surviving allantois-on-shell. J Hyg. (Lond) 1958;56:151.

Ferber E, Resch K, Wallach DFH, Imm W. Isolation and characterization of lymphocyte plasma membranes. Biochim Biophys Acta. 1972;266:494-504.

Firth GA. Occurrence of an infectious bursal syndrome within an Australian poultry flock. Aust Vet J. 1974;50:128-30.

Fitze-Gschwind V. Zur Entwicklung der Chorioallantoismembran des Hühnchens. Anat. Embryol Cell Biol. 1973;47:1-2.

Fotiadis C, Kilpatrick DR, Lipton HL. Comparison of the binding characteristics to BHK-21 cells of viruses representing the two Theiler's Virus neurovirulence groups. *Virology*. 1991;182:365-70.

Franke WW. Differentiation-related patterns of expression of proteins of intermediate filaments in tissues and cultured cells. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1982;46:43-53.

Fuchs A, Lindenbaum ES. The two- and three-dimensional structure of the microcirculation of the chick chorioallantoic membrane. *Anat Rec*. 1988;131:271-5.

Fujie T, Shikiji T, Uchida N, Urano Y, Nagae H, Arase S. Culture of cells derived from the human sebaceous gland under serum-free conditions without a biological feeder layer or specific matrices. *Arch Dermatol Res*. 1996;288:703-8.

Giambrone JJ, Glosser J. Efficacy of live vaccines against serologic subtypes of infectious bursal disease virus. *Avian Dis*. 1990;34:7-11.

Gibbs S, Pinto ANS, Murli S, Huber M, Hohl D, Ponc M. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair Regen*. 2000;8:192-7.

Girjes, AA, Lee KE, Carrick FN. Establishment and characterization of a new epithelial cell line, KC-1, from koala (*Phascolarctos cinereus*) conjunctiva. *In Vitro Biol J*. 2003;39:110-13.

Girolamo ND, Telda N, Kumar RK, McCluskey P, Lloyd A, Coroneo M, Wakefield D. Culture and characterization of epithelial cells from human pterygia. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:1077-82.

Granzow H, Birghan C, Mettenleiter TC, Beyer J, Kollner B, Mundt E. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol*. 1997;71:8879-85.

Greeff N, Humbel R. Long-term cultivation of cryopreserved human fetal brain cells in a chemically defined medium. *J Neurosci Methods*. 1989;30:121-31.

Grown AM, Vogel AM. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. III. Analysis of tumors. *Am J Clin Pathol.* 1985;84:413-24.

Guidry AJ, O'Brien CN, Douglass LW. A bovine mammary endothelial/epithelial cell culture model of the blood/milk barrier. *Can J Vet Res* 1998;62:117-21.

Hafez HM, Prusas C, Raue R. Very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) in vaccinated broiler flock: Course of the disease, identification and characterization of isolated strain. *Arch Geflügelk.* 2003;67:2-5.

Ham RG. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1965;53:288-93.

Hamburger V, Hamilton H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 1951;88:49-92.

Harkness JW, Alexander DJ, Pattison M, Scott AC. Infectious bursal disease agent: morphology by negative strain electron microscopy. *Arch Virol.* 1975;48:63-73.

Hassan MK, Saif YM. Influence of the host system on the pathogenicity, immunogenicity, and antigenicity of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 1996;40:553-61.

Hassan MK, Nielsen CK, Ward LA, Jackwood DJ, Saif YM. Antigenicity, pathogenicity, and immunogenicity of small and large plaque infectious bursal disease virus clones. *Avian Dis.* 1996;40:832-6.

Hassan MK, Afify M, Aly MM. Susceptibility of vaccinated Egyptian chickens to very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 2002;31:149-56.

Haun G, Keppler O, Bock T, Herrmann M, Zentgraf H, Pawlita M. The cells surface receptor is a major determinant restricting the host range of the B-lymphotropic papovavirus. *J Virol.* 1993;67:7482-92.

He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ, Feng MF. Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell Prolif*. 2004;37:177-5.

Heine HG, Haritou M, Failla P, Fahey K, Azad A. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. *J Gen Virol*. 1991;72:1835-43.

Hirai K, Calnek BW. In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chicken B lymphocytes. *Infect Immun*. 1979;25:964-70.

Hirai K, Shimakura S. Structure of infectious bursal disease virus. *J Virol*. 1974;14:957-64.

Hitchner SB. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs. *Poult Sci*. 1970;49:511-6.

Hitchner SB. Persistence of parental infectious bursal disease antibody and its effect on susceptibility of young chickens. *Avian Dis*. 1971;15:894-900.

Hollander DA, Hakimi MY, Hartmann A, Wilhelm K, Windolf. The influence of hyperbaric oxygenation (NBO) on proliferation and differentiation of human keratinocyte in vitro. *Cell Tissue Bank*. 2000;1:261-9.

Hoque MM, Omar AR, Hair-Bejo M, Aini I. Sequence and phylogenetic analysis of the VP2 gene of very virulent infectious bursal disease virus isolates. *J Biochem Mol Biol Biophys*. 2002;6:93-9.

Howie RI, Thorsen J. Identification of strain of infectious bursal disease virus from mosquitoes. *Can J Comp Med*. 1981;45:315-20.

Hu DN, Ritch R, McCormick SA, Pelton-Henrion K. Isolation und cultivation of human Iris pigment epithelium. *Invest Ophtalmol Vis Sci*. 1992;33:2443-53.

Hudson PJ, McKern NM, Power BE, Azad AA. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucl Ac Res*. 1986;14:5001-12.

Ide PR. A comparison of gel diffusion, fluorescent antibody and virus isolation methods in experimental and natural cases of infectious bursal disease. *Can J comp Med.* 1975;39:183-190.

Ide PR, Stevenson RG. in: Röhrer H. (Hrsg.): *Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren.* Bd. VI/2, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1978.

Islam MR, Zierenberg K, Müller H. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch Virol.* 2001;146:2481-92.

Ismail NM, Saif YM, Moorhead PD. Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens. *Avian Dis.* 1988;32:757-9.

Itami T, Maeda M, Kondo M, Takahashi Y. Primary culture of lymphoid organ cells and haemocytes of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Methods cell Sci.* 1999;21:237-44.

Jackwood DH, Saif YM. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 1987;31:766-70.

Jackwood DJ, Sommer SE. Restriction fragment polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. *Avian Dis.* 1999;43:310-4.

Jackwood DJ, Saif YM, Hughes JH. Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys. *Avian Dis.* 1982;26:871-82.

Jackwood DJ, Saif YM, Hughes JH. Nucleic acid and structural proteins of infectious bursal disease virus isolates belonging to serotypes I and II. *Avian Dis.* 1984;28:990-1006.

Jackwood DJ, Saif YM, Hughes JH. Replication of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. *Avian Dis.* 1987;31:370-5.

Jackwood DJ, Saif YM, Moorhead PD. Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. *Avian Dis.* 1985;29:1184-94.

Jackwood DJ, Spalding BD, Sommer SE. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction detection and analysis of nucleotide sequences coding for a neutralizing epitope on infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 2003;47:738-44.

James A, McAteer W, Douglas HJ. Monolayer culture techniques. *Methods Enzymol.* 1979; Vol LVIII: 132-140.

Jagadish MN, Staton VJ, Hudson PJ, Azad AA. Birnavirus precursor polypeptide is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide. *J Virol.* 1988;62:1084-87.

Jasmund I, Langsch A, Simmoteit R, Bader A. Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. *Biotechnol. Prog.* 2002;18:839-46.

Johnson PA, Rosner MR. Characterization of murine-specific leukaemia virus reseptor from L-cells. *J Virol.* 1986;58:900-8.

Jungmann A. In vitro- und in vivo-Untersuchungen zur Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese der Infektiösen Bursitis des Huhnes [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2001.

Jungmann A, Nieper H, Müller H. Apoptosis is induced by infectious bursal disease virus replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *J Gen Virol.* 2001;82:1107-15.

Kabell S, Handberg KJ, Kusk M, Bisgaard M. Detection of infectious bursal disease virus in various lymphoid tissues of experimentally infected specific pathogen free chickens by different reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Avian Dis.* 2005;49:534-9.

Karam SM, Leoblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. II. Outward migration of pit cells. *Anat Rec.* 1993;236:280-96.

Katara RS, Tiwari AK, Nanthakumar T, Goswami PP. One-step RT-PCR for the detection of infectious bursal disease virus in clinical samples. *Vet Res Commun.* 2001;25:429-36.

Käufer I, Weiss E. Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect Immun.* 1980;27:364-7.

Kibenge FS, Dhama V. Evidence that virion-associated VP1 of avibirnaviruses contains viral RNA sequences. *Arch Virol.* 1997;142:1227-36.

Kibenge FS, Dhillon AS, Russel RG. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol.* 1988a;69:1757-75.

Kibenge FS, Dhillon AS, Russell RG. Growth of serotypes I and II and variant strains of infectious bursal disease virus in Vero cells. *Avian Dis.* 1988b;32:298-303.

Kibenge FS, Qian B, Cleghorn JR, Martin CK. Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases. *Arch Virol.* 1997;142:2401-19.

Kim IJ, Karaca K, Pertile TL, Erickson SA, Sharma JM. Enhanced expression of cytokine genes in spleen macrophages during acute infection with infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;61:331-41.

Kim IJ, Gagic M, Sharma JM. Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 1999;43:401-13.

Kösters J, Becht H, Rudolph R. Properties of the infectious bursal disease agent of chickens (IBA). *Med Microbiol Immunol. (Berl).* 1972;157:291-8.

Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 1984;10:203-9.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.

Lam KM. Morphological evidence of apoptosis in chickens infected with infectious bursal disease virus. *J Comp Pathol.* 1997;116:367-77.

Landgraf H, Vielitz E, Hitchner SB. Der Einfluss einer Gumboro-Virus-Infektion auf Legeleistung und Schlupffähigkeit sowie den Gesundheitszustand der Küken. 6. Europ-Geflügel-Konferenz, Hamburg, 1980;(VI):424-31.

Landmann L. The epidermal permeability barrier. *Anat Embryol.* 1988;178:1-13.

Lange H. Die Bildung und interferierende Wirkung inkompletter Partikel des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) [Dissertation med. vet]. Gießen: Univ. Gießen; 1985.

Lange H, Müller H, Käufer I, Becht H. Pathogenic and structural properties of wild type infectious bursal disease virus (IBDV) and virus grown in vitro. *Arch Virol.* 1987;92:187-96.

Laurin T, Schmitz U, Riediger D, Frank HG, Stoll C. Die Chorioallantoismembran befruchteter Vogeleier als Substrat zur Testung der Invasivität von Karzinomen. *Mund-, Kiefer-Gesichtschirurgie.* 2004;8:223-8.

Lee LH, Yu SL, Shieh HK. Detection of infectious bursal disease virus infection using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 1992;40:243-53.

Leeson TS, Leeson CR. The chorio-allantoic of chick. Light and electron microscopic observation at various times of incubation. *J Anat.* 1963;97:585-95.

Levy L, Broad S, Zhu AJ, Carroll JM, Peault B, Watt FM. Optimised retroviral infection of human epidermal keratinocytes: long-term expression of transduced integrin following grafting on to SCID mice. *Gene Ther.* 1998;7:913-22.

Ley DH, Yamamoto R, Bickford AA. The pathogenesis of infectious bursal disease: serologic, histopathologic and clinical chemical observations. *Avian Dis.* 1983;27:1060-85.

Lim BL, Cao Y, Yu T, Mo CW. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *J Virol.* 1999;73:2854-62.

Lima A, Fehervari T, Paasch LH, Calderon NL. Haematological and histological findings in Leghorn chickens infected with infectious bursal disease virus strain 73688. *Acta Vet Hung.* 2005;53:501-6.

Lin Z, Kato A, Otaki Y, Nakamura T, Sasmaz E, Ueda S. Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis.* 1993;37:315-23.

Lombardo E, Maraver A, Casten JR, Rivera J, Fernandez-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL, Rodriguez JF. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*. 1999;277:345-57.

Lombardo E, Maraver A, Espinosa I, Fernandez-Arias A, Rodriguez JF. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*. 2000;277:345-57.

Lukert PD, Davis RB. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. *Avian Dis.* 1974;18:243-50.

Lukert PD, Leonard J, Davis RB. Infectious bursal disease virus: antigen production and immunity. *Am J Vet Res.* 1975;36:539-40.

Lukert PD, Saif YM. Infectious bursal disease. In: *Diseases of poultry*, 10th ed (Eds. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM). Iowa State University Press, Iowa. 1997;721-38.

Maruoka Y. Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238:886-90.

Mathias NR, Kim KJ, Robinson TW, Lee VHL. Development and characterization of rabbit tracheal epithelial cell monolayer models for drug transport studies. *Pharm Res.* 1995;12:1499-1505.

Matsuyama T, Izumy Y, Sueda T. Culture and characterization of human junctional epithelial cells. *J Periodontol.* 1997;68:229-39.

Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B, Wittman G. Virologische Arbeitsmethoden: Band I. Fischer Verlag. Jena. 1974:13.

McAteer JA, Davis JM. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In: Basic cell culture, 2nd Edition (Ed. Davis JM.). Oxford University Press, 2002;165-7.

McFerran JB, McNulty MS, McKillop ER, Connor TJ, McCracken RM, Collins DS. Isolation and serological studies with infectious bursal disease virus from fowl, turkeys and ducks: demonstration of a second serotype. Avian Pathol. 1980; 9:395-404.

McNulty MS, Allan GM, McFerran JB. Isolation of infectious bursal disease from turkeys. Avian Pathol. 1979;8:205-212.

Metcalf J, Stock MK. Current topic: oxygen exchange in the chorioallantoic membrane, avian homologue of the mammalian placenta. Placenta. 1993;14(6):605-13.

Moll R, Franke WW, Schiller DL. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell. 1982;31:11-24.

Moradian A, Thorsen J, Julian RJ. Single and combined infections of specific-pathogen-free chickens with infectious bursal disease virus and an intestinal isolate of reovirus. Avian Dis. 1990; 34: 63-72.

Morgan J.F. The nutrition of animal tissues cultivated in vitro. I. A survey of natural materials as supplements to synthetic medium. J.N.C.I. 1955; 16: 557-567.

Müller H. Replication of infectious bursal disease virus in lymphoid cells. Arch Virol. 1986a;87:191-203.

Müller H. Untersuchungen über die Struktur und biologische Eigenschaften des Virus der Infektiösen Bursitis der Hühner (IBDV) [Habilschr. med. vet]. Gießen: Univ. Gießen; 1986b.

Müller HK. Strukturelle und pathogene Eigenschaften der beiden Serotypen sowie einer Reassortanten des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) [Dissertation med. vet], Gießen: Univ. Gießen; 1987.

Müller H, Becht H. Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. *J Virol.* 1982;44:384-92.

Müller H, Nitschke R. Molecular weight determination of the two segments of double-stranded RNA of infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *Med Microbiol Immunol.* 1987a;176:113-21.

Müller H, Nitschke R. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Viol.* 1987b;159:174-7.

Müller H, Scholtissek C, Becht H. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol.* 1979a;31:584-9.

Müller H, Lange H, Becht H. Formation, characterization and interfering capacity of a small plaque mutant and of incomplete virus particles of infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 1986;4:297-309.

Müller H, Schnitzler D, Bernstein F, Becht H, Cornelissen D, Lütticken DH. Infectious bursal disease of poultry: antigenic structure of the virus and control. *Vet Microbiol.* 1992;33:175-183.

Müller R, Käufer I, Reinacher M, Weiss E. Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV). *Zbl Vet Med* 1979b;B26:345-52.

Mundt E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J Gen Virol.* 1999;80:2067-76.

Mundt E, Beyer J, Müller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol.* 1995;76:437-43.

Mundt E, Kollner B, Kretschmar D. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol.* 1997;71:5647-51.

Narbraitz R. Structure of the intra-chorionic blood sinus in the chick embryo. *J Anat.* 1977;124:347-54.

Narita M, Umiji S, Furuta K, Shirai J, Nakamura K. Pathogenicity of avian nephritis virus in chicks previously infected with infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 1991;20:101-11.

Nick H, Cursiefen D, Becht H. Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. *J Virol.* 1976;18:227-34.

Nieper H. Untersuchungen zur Zelltypspezifität pathogener und apathogener Stämme des Virus der infektiösen Bursitis (IBDV) [Dissertation med. vet]. Gießen: Univ. Gießen; 1995.

Nieper H, Müller H. Rapid preparation of plasma membranes from avian lymphoid cells and fibroblasts for virus binding studies. *J Virol Methods.* 1998;72:153-62.

Nieper H, Müller H. Susceptibility of chicken lymphoid cells to infectious bursal disease virus does not correlate with the presence of specific binding sites. *J Gen Virol.* 1996;77:1229-37.

Oberländer Y. Herstellung und Charakterisierung von Serotyp1-/Serotyp 2-Rekombinanten des Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV). [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2004.

Oda D, Dale BA, Bourekis G. Human oral epithelial cell culture. II. Keratin expression in fetal and adult gingival cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990;26(6):596-603.

Okabe T. Long-term cultivation and differentiation of human erytroleukemia cells in a protein-free chemically defined medium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81:453-5.

Okoye JOA, Okeke CN, Ezeobele FKO. Effect of infectious bursal disease virus infection on the severity of *Aspergillus flavus* aspergillosis on chickens. *Avian Pathol.* 1991;20:167-71.

Öppling V. Die Induktion neutralisierender Antikörper durch das Strukturprotein VP2 des Virus der infektiösen Bursitis (IBDV) [Dissertation med. vet]. Gießen: Univ. Gießen; 1991.

Öppling V, Müller H, Becht H. Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing antibodies in infectious bursal disease virus. *Arch Virol.* 1991;19:211-23.

Özel M, Gelderblom H. Capsid symmetry of viruses of the proposed Birnavirus group. *Arch Virol.* 1985;84:149-61.

Palmquist JM, Khatri M, Cha RM, Goddeeris BM, Walcheck B, Sharma JM. In vivo activation of chicken macrophages by infectious bursal disease virus. *Viral Immunol.* 2006;19:305-15.

Pereira SR, Travassos CE, Huguenim A, Guimaraes AC, Silva AG, Guimaraes MA. Western blot detection of infectious bursal disease virus infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:671-4.

Petek M, D'Aprile PN, Cancelloti F. Biological and physiochemical properties of the infectious bursal disease virus (IBDV). *Avian Pathol.* 1973;2:135-152.

Peters MA, Lin TL, Wu CC. Real-time RT-PCR differentiation and quantitation of infectious bursal disease virus strains using dual-labeled fluorescent probes. *J Virol Methods.* 2005;127:87-95.

Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Cline P, Hincenbergs M. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol.* 1990;143:294-302.

Radi ZA, Ackermann MR. Growth of differentiated ovine tracheal epithelial cells in vitro. *Vet Med Series A.* 2004;51:167-9.

Raue R, Islam MR, Islam MN, Islam KM, Badhy SC, Das PM, Müller H. Reversion of molecularly engineered, partially attenuated, very virulent infectious bursal disease virus during infection of commercial chickens. *Avian Pathol.* 2004;33:181-9.

Rautenschlein S, Yeh HY, Njenga MK, Sharma JM. Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch Virol.* 2002;147:285-304.

Reddy SK, Silim A, Ratcliffe MJH. Biological roles of the major capsid proteins and relationships between the two existing serotypes of infectious bursal disease virus. *Arch Virol.* 1992;127:209-22.

Remorini P, Calderon MG, Aquirre S, Periolo O, La Torre J, Mattion N. Characterization of infectious bursal disease viruses from Argentina. *Avian Dis.* 2006;50:245-1.

Rheinwald JG. Serial cultivation of normal human keratinocytes. *Methods Cell Biol.* 1980; 21A:229-54.

Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-43.

Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int. J Dev Biol.* 1996;40:1189-97.

Rizzo V, Kim D, Duran WN, DeFouw DO. Differentiation of the microvascular endothelium during early angiogenesis and respiratory onset in the chick chorioallantoic membrane. *Tissue Cells.* 1995;27: 159.

RizzoV, DeFouw DO. Macromolecular selectivity of chick chorioallantoic membrane microvessels during normal angiogenesis and endothelial differentiation. *Tissue Cells* 1993;25:847-56.

Robertson DM, Li L, Fisher S, Pearce WP, Shay JW, Wright WE, Cavanagh D, Jester JV. Characterization of growth and differentiation in a telomerase-immortalized human corneal epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:470-6.

Rodriguez-Chavez IR, Rosenberger JK, Cloud SS, Pope CR. Characterization of the antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to

propagation in different host systems (bursa, embryo, and cell culture). III. Pathogenicity. *Avian Pathol.* 2002;31:485-92.

Romanoff AL. The extraembryonic membranes. In: *The avian embryo: Structural and functional development*. New York: The Macmillan Company. 1960:1039-140.

Röpke C. Thymic epithelial cell culture. *Microsc Res Tech.* 1997;38:276-8.

Rosenberger JK, Cloud SS. Isolation and characterization of variant infectious bursal disease virus. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;189:357-62.

Rosenberger JK, Cloud SS, Gelb J, Odor E, Dohms JE. Sentinel bird survey of Delmarva broiler flocks. In: *Proceedings of the 20th National Meeting of Poultry Health and Condemnations*; Ocean City, MD USA. 1985;194-202.

Rosenberger JK, Cloud SS, Metz A. Use of infectious bursal disease variant vaccines in broilers and broiler breeders. 36. Western Poultry Disease Conference, Davis, Kalifornien. 1987;110-1.

Rüsse I, Sinowatz F. *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere*. Parey. Hamburg. 1991;2004-6.

Sadovnikova E.Y. Long-term serial cultivation of human vascular endothelial cells. *Biomed Sci.* 1990;1:199-205.

Samuel I, Mihail A, Teodosiu O, Barnaure F, Coban E, Petrescu A, Matinca D. Comparative results of respiratory virus isolation attempts in chorioallantoic membrane fragments and embryonated chicken eggs. *Virol.* 1981a; 32:297-303.

Samuel I, Tomas E, Barnaure F. Investigations concerning the cultivation of myxo- und paramyxoviruses on chorioallantoic membrane fragments. Note I: Data on the multiplication of several myxo- and paramyxoviruses. *Virol.* 1981b;32:145-54.

Santos AR Jr, Dolder H, Wada ML. Dexamethasone and fetal calf serum effects in differentiation of Vero cells cultured on type I collagen gel. *J Submicrosc. Cytol Pathol.* 2003;35:35-42.

Sanchez AB, Rodriguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Viol.* 1999;262:190-9.

Sapats SI, Ignjatovic J. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Arch Virol.* 2000;145:773-85.

Schat KA, Lucio B, Carlisle JC. Pathogenesis of infectious bursal disease in embryonally bursectomized chickens. *Avian Dis.* 1981;25:996-1004.

Schnitzler D, Bernstein F, Müller H, Becht H. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. *J Gen Virol.* 1993;74:1563-71.

Schröder A, Van Loon AA, Goovaerts D, Mundt E. Chimeras in noncoding regions between serotypes I and II of segment A of infectious bursal disease virus are viable and show pathogenic phenotype in chickens. *J Gen Virol.* 2000;81:533-40.

Schünemann B. Untersuchungen über eine persistierende Infektion des Virus der infektiösen Bursitis im Hühnerembryo. [Dissertation med. vet]. Gießen: Univ. Gießen; 1986.

Seo HR, Kwan YW, Cho CK, Bae S, Lee SJ, Soh JW, Chung HY, Lee YS. RKC- α induces differentiation through ERK1/2 phosphorylation in mouse keratinocytes. *Exp Molecul Med.* 2004;36:292-9.

Sethi N, Brookes M. Ultrastructure of the blood vessels in the chick allantoic and chorioallantoic. *J Anat.* 1971;109:1-15.

Seto JT, Garten W, Rott R. The site cleavage in infected cells and polypeptides of representative paramyxoviruses grown in cultured cells of the chorioallantoic membrane. *Arch Virol.* 1981;67:19-30.

Sharma JM. Embryo vaccination of specific-pathogen-free chickens with infectious bursal disease virus: tissue distribution of the vaccine virus and protection of hatched chickens against disease. *Avian Dis.* 1986;30:776-80.

Sharma JM, Fredericksen TL. Mechanisms of T cell immunosuppression by infectious bursal disease virus of chickens. *Proc Av Immunol.* 1987;238:283-94.

Sharma JM, Dohms JE, Metz AL. Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.* 1989;33:112-24.

Sharma JM, Kim IJ, Rautenschlein S, Yeh HY. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol.* 2000;24:223-35.

Shen J, Elbert KJ, Yamashita F, Lehr CM, Kim LJ, Lee VHL. Organic cation transport in rabbit alveolar epithelial cell monolayers. *Pharm Res.* 1999; 12:1279-86.

Silva SEL, Ferreira HL, Carvalho BA, Cardoso TC. Susceptibility of mammalian cell line for isolation of IBDV from clinical samples. *Braz J of Poultry Science.* 2004;6:65-69.

Skeeles JK, Slavik M, Beasley JN, Brown AH, Meinecke CF, Maruca S. An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with infectious bursal disease virus. *Am J Vet Res.* 1980;41:1458-61.

Snedeker CF, Wills K, Moulthrop IM. Some studies on the infectious bursal agent. *Avian Dis.* 1967;11:519-28.

Snyder DB. Changes in the field status of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 1990; 19:419-23.

Snyder DB, Lana DP, Savage PK, Yancey FS, Mengel SA, Marquardt WW. Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis.* 1988;32:535-9.

Snyder DB, Vakharia VN, Savage PK. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch Virol.* 1992;127:89-101.

Solano W, Giambrone JJ, Williams JC, Lauerman LN, Panagala VS, Garces C. Effect of maternal antibody on timing of initial vaccination of young white leghorn chickens against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 1986;30:648-52.

Song KH, Ko SH, Ahn AB, Yoo SJ, Chin H, Kaneto H, YoonKH, Cha BY, Lee KW, Son HY. In vitro transdifferentiation of adult pancreatic acinar cells into insulin expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316:1094-100.

Spies U, Müller H. Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *J Gen Virol.* 1990;71:977-981.

Spies U, Müller H, Becht H. Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res.* 1987;8:127-40.

Subler KA, Mickael CS, Jackwood DJ. Infectious bursal disease virus-induced immunosuppression exacerbates *Campylobacter jejuni* colonisation and shedding in chickens. *Avian Dis.* 2006;50:179-84.

Suzuki T, Yamaya M, Sekizawa K. Effect of dexamethasone on rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Am J Physiol.* 2000;278:560-71.

Takase, K, Baba, GM, Ariyoshi R, Fujikawa H. Susceptibility of chicken embryos to highly virulent infectious bursal disease virus. *J Vet Med Sci.* 1996;58:1129-31.

Tazawa H. Gas transfer in the chorioallantoic. In: *Respiratory Function in Birds, Adult and Embryonic.* Springer-Verlag, Berlin / Heidelberg / New-York. 1978;274-91.

Terajima M, Yamaya M, Sekizawa K. Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium: role of ICAM-1 and IL-1 β . *Am J Physiol.* 1997;273:749-59.

Terepka AR, Stewart ME. Transportfunction of the chick chorioallantoic membrane. II. Active transport, in vitro. *Exp Cell Res.* 1969;58:107-17.

Tham KM, Young LW, Moon CD. Detection of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification of the virus segment A gene. *J Virol Methods.* 1995;53:201-12.

Ubol S, Griffin DE. Identification of a putative alpha-virus receptor on mouse neural cells. *J Virol.* 1991;65:6913-21.

Upasani OS, Vaidya MM, Bhisey AN. Database on monoclonal antibodies to Cytokeratins. *Oral Oncolog.* 2004;40:236-56.

van den Berg T.P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.* 2000;29:175-194.

van den Berg TP, Gonze M, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of highly virulent strains. *Avian Pathol.* 1991;20:133-43.

van den Berg TP, Gonze M, Morales D, Meulemans G. Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* 1996;25:751-68.

van den Berg TP, Morales D, Eterradosi N, Rivallan G, Toquin D, Raue R, Zierenberg K, Zhang MF, Zhu YP, Wang CQ, Zheng HJ, Wang X, Chen GC, Lim BL, Müller H. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol.* 2004;33:470-6.

van den Sluis W. World poultry disease update. *World Poult.* 1999;15:30-32.

van Golde J, Mulder T, Straaten H, Blanco CE. The chorioallantoic artery blood flow of the chick embryo from stage 34 to 43. *Pediatr Res.* 1996;40:867-71.

van Loon AA, De Haas N, Zeyda I, Mundt E. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *J Gen Virol.* 2002;83:121-9.

van Muijen GN, Warnaar SO, Ponc M. Differentiation-related changes of cytokeratin expression in cultured keratinocytes and fetal, newborn and adult epidermis. *Exp Cell Res.* 1987;171:331-45.

Vasconcelos AC, Lam KM. Apoptosis induced by infectious bursal disease virus. *J Gen Virol.* 1994;75:1803-6.

Verdin EM, King GL, Maratos-Flier E. Characterisation of a common high-affinity receptor for reovirus serotypes 1 and 3 on endothelial cells. *J Virol.* 1989;63:1318-25.

von Magnus P. Incomplete forms of influenza virus. *Adv Virus Res.* 1954;2:59-79.

Wang XM, Zeng XW, Gao HL, Fu CY, Wei P. Changes in VP2 gene during the attenuation of the very virulent infectious bursal disease virus strain GX isolated in China. *Avian Dis.* 2004;48(1):77-83.

Wang X, Zhang H, Gao H, Fu C, Gao Y, Ju Y. Changes in VP3 and VP5 genes during the attenuation of the very virulent infectious bursal disease virus strain GX isolated in China. *Virus Genes.* 2007;34(1):67-73.

Waymouth C. Animal cell culture. *In Vitro.* 1974;19:97-100.

Wiche R, Seitz J, Wilhelm B. Establishing of two in vitro models of epithelial cells from the apocrine secreting rat coagulating gland. *Andrologia.* 2003;35:342-53.

Widdicombe, JH. Culture of tracheal epithelial cells. In: *Methods bronchial mucology* (Braga PC, Allegra L), Raven Press, New York. 1988. 291-302.

Williams GM, Gunn JM. Long-term cell culture of adult rat liver epithelial cells. *Exp Cell Res.* 1974;89:139-42.

Winterfield RW. Immunity response to the infectious bursal agent. *Avian Dis.* 1969;13:548-57.

Winterfield RW, Hitchner SB. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chicken. *Am J Vet Res.* 1962;23:1237-8.

Winterfield RW, Fadly AM, Bickford A. Infectivity and distribution of infectious bursal disease virus in the chicken. Persistence of the virus and lesions. *Avian Dis.* 1972;16:622-32.

Woodruff AM, Goodpasture EW. The susceptibility of the chorioallantoic membrane of chick embryos to infection with fowl-pox virus. *Am J Path.* 1931;7:209.

Wu, CC, Lin TL, Zhang HG, Davis VS, Boyle JA. Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 1992;36:221-6.

Xue CY, Lim BL. In situ localization of infectious bursal disease virus-binding cells by a biotin-streptavidin system. *Avian Dis.* 2001;45:504-11.

Yamada S, Matsuo K, Uchinuno Y. Susceptibility of ducks and duck-origin cell cultures to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 1982;26:596-601.

Yamaguchi T, Kondo T, Inoshima Y, Ogawa M, Miyoshi M, Yanai T, et al. In vitro attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: some characteristics of attenuated strains. *Avian Dis.* 1996a;40:501-509.

Yamaguchi T, Ogawa M, Inoshima Y, Miyoshi M, Fukushi H, Hirai K. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Viol.* 1996b; 223:219-23.

Yamaguchi T, Ogawa M, Miyoshi M, Inoshima Y, Fukushi H, Hirai K. Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch Virol.* 1997;142:1441-58.

Yamaschita F, Kim KJ, LeeVH. Dipeptide uptake and Transport characteristics in rabbit tracheal epithelial cell layers cultured at an air interface. *Pharm Res.* 1998;15:979-83.

Yamaya M, Finkbeiner WE, Chun SY, Widdicombe JH. Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am J Physiol.* 1992;262:713-24.

Yamaya M, Sekizawa K, Suzuki T. Infection of human respiratory submucosal glands with rhinovirus: effects on cytokine and ICAM-1 production. *Am J Physiol.* 1999;277:362-71.

Yao K, Vakharia VN. Induction of apoptosis in vitro by the 17-kDa non-structural protein of infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. *Virology.* 2001;285:50-8.

Yehuda H, Pitcovski J, Michael A, Gutter B, Goldway M. Viral protein 1 sequence analysis of three infectious bursal disease virus strains: a very virulent virus, its attenuated form, and an attenuated vaccine. *Avian Dis.* 1999;43:55-64.

Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol.* 1989;109:1207-17.

Zamansky GB, Nguyen U, Chou IN. An immunofluorescence study of the effects of ultraviolet radiation on the organisation of microfilaments, keratin intermediate filaments, and microtubules in human keratinocytes. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1992;22:296-306.

Zierenberg K. Herstellung von Serotyp 1-/Serotyp 2-Reassortanten des Virus der infektiösen Bursitis (IBDV) und Bestimmung einiger biologischer Eigenschaften in vitro [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2001.

Zierenberg K, Raue R, Müller H. Rapid identification of "very virulent" strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol.* 2001;30:55-62.

Anhang

Lösungen, Puffer und Medien

Die chemischen Grundstoffe wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), E. Merk (Darmstadt), Life Technologies (Eggenstein) und Boehringer (Mannheim) bezogen.

Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich um wässrige Lösungen.

| | | | |
|--|-----------|-------------------------------------|-------------------------|
| Acrylamid / Bisacrylamid (50:0,8) | | dNTP-Mix | |
| Acrylamid | 50%(w/v) | dATP | 2,5 µM |
| Bisacrylamid | 0,8%(w/v) | dCTP | 2,5 µM |
| | | dGTP | 2,5 µM |
| | | dTTP | 2,5 µM |
| Acrylamid / Bisacrylamid (50:1,5) | | Ethanol | |
| Acrylamid | 50%(w/v) | | absolut |
| Bisacrylamid | 1,5%(w/v) | | 70% (v/v) |
| Agar-Overlay (Plaquetest) | | Ethidiumbromid | |
| 2 x DMEM | 50% | | 10mg/ml |
| 1,4% purified Agar (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) | 47,5% | FACS-Puffer pH 7,4 | |
| Penicillin / Streptomycin | 0,5% | PBS | 96,9% |
| Neutralrot (2,5 g/l) | 2% | FKS | 3% |
| | | NaN ₃ | 0,1% |
| Ammoniumpersulfat | 3%(w/v) | FACS-Fixierungslösung pH 7,4 | |
| | | Formalin | 2% |
| Anodenpuffer I | | FACS-Puffer | 98% |
| Tris-Base | 300 mM | FACS-Tryton-Puffer | |
| Methanol | 20% (v/v) | Triton X-100 | 1% |
| Anodenpuffer II | | FACS-Puffer | 99% |
| Tris-Base | 25 mM | Giemsa-Farbe | |
| Methanol | 20% (v/v) | | 0,5ml/10ml Aqua bidest. |
| Calciumchlorid | 100 mM | GKN 1 pH 7,4 | |
| Chloronaftol-Substrat | | Hepes | 10 mM |
| 4-Chlor-1-Naphtol in Methanol | 3g/100 ml | Glukose | 0,1% |
| | | KCl | 0,04% |
| | | NaCl | 0,8% |
| Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) (Biochrom, Berlin) | | H ₂ O dem. | |
| Dexamethason | 0,5 mM | GKN 2 pH 7,4 | |
| | | Hepes | 10 mM |
| | | Glukose | 0,2% |
| | | KCl | 0,05% |
| | | NaCl | 0,39% |
| | | H ₂ O dem. | |

Kollagenase-Hyaluronidase 5x

| | |
|---------------------------|--------|
| Kollagenase | 0,05% |
| Hyaluronidase | 0,005% |
| in PBS (steril filtriert) | |

Kathodenpuffer

| | |
|--------------------|-----------|
| Tris-Base | 25 mM |
| 6-Aminokapronsäure | 40 mM |
| Methanol | 20% (v/v) |

Kulturmedium für CAM-Epithelzellen**F12-Basismedium**

| | |
|---------------------------------|--------------|
| Hepes | 10 mM |
| NaOH 10N | 30 µl/100 ml |
| Penicillin / Streptomycin 100 x | 1:100 |
| Glutamin | 6 mM |
| Na-Pyruvat 100 x | 1:100 |
| in Ham's F12 Nutrient Mixture | |

F12-Komplettmedium

| | |
|--|----------|
| Insulin | 5 µg /ml |
| ITF 100 x | 1:100 |
| Dexamethasone | 100 nM |
| Synthetischer Serumersatz 1000 x (Biochrom, Berlin) | 1:1000 |
| in F12-Basismedium | |

Kulturmedium für HEF

| | |
|--------------------------------|-------|
| FKS (Biochrom, Berlin) | 5% |
| Penicillin / Streptomycin 100x | 1:100 |
| in 1 x DMEM 4,5% Glukose | |

Kulturmedium für HEL-Zellen

| | |
|--------------------------------|--------------|
| FKS (Biochrom, Berlin) | 5% |
| Penicillin / Streptomycin 100x | 1:100 |
| Hepes | 10 mM |
| NaOH 10N | 30 µl/100 ml |
| Glutamin | 6 mM |
| in Williams'E Medium | |

Laemmli-Probenpuffer

| | |
|---------------------|-------------|
| Harnstoff 8M | 50% |
| Spacer-Gel-Puffer | 20% (v/v) |
| Glycerol | 20% (v/v) |
| SDS | 2% (w/v) |
| β – Mercaptoethanol | 2% (v/v) |
| Bromphenolblau | 0,02% (w/v) |

LB-Agar

| | |
|--------------|----------|
| Agar | 1% (w/v) |
| in LB-Medium | |

LB-Medium

| | |
|----------------------|------------|
| Casein, hydrolysiert | 1% (w/v) |
| NaCl | 1% (w/v) |
| Hefeextrakt | 0,5% (w/v) |

Lösung 1 (Resuspensionspuffer) pH8

| | |
|-----------|-----------|
| RNase A | 100 µg/ml |
| Glukose | 50 mM |
| Tris-Base | 25 mM |
| EDTA | 10 mM |

Lösung 2 (Lysispuffer)

| | |
|------|----------|
| NaOH | 200 mM |
| SDS | 1% (w/v) |

Lösung 3 (Neutralisationspuffer) pH4,8

| | |
|---------------|-------------|
| Natriumacetat | 3 M |
| Eisessig | 11,5% (v/v) |

Natriumiodid-Lösung

| | |
|---------------------------------|-------|
| NaI | 6 M |
| Na ₂ SO ₃ | 40 mM |

New-Waschpuffer

| | |
|--------------------|-------|
| Ethanol | 50% |
| Tris / HCl, pH 7,5 | 10 mM |
| NaCl | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) pH7,2

| | |
|----------------------------------|----------|
| NaCl | 136,9 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 8,1 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |

PBS-Tween

| | |
|----------|-------|
| Tween 20 | 0,05% |
| in PBS | |

Penicillin / Streptomycin x100

| | |
|--------------|--------------|
| Penicillin | 10.000 IU/ml |
| Streptomycin | 10.000 µg/ml |

Roti-Histol® (Entparaffinierungslösung)

| | |
|------------|-----------|
| SDS | 10% (w/v) |
| | 20% (w/v) |

Spacer-Gel-Puffer

Tris-Base 300 mM
pH 6,7 mit H_3PO_4 einstellen

TAE-Puffer, 50x pH8,5

| | |
|-----------|------------|
| Tris-Base | 2 M |
| Eisessig | 5,7% (v/v) |
| EDTA | 100 mM |

Trypsin-EDTA-Stammlösung x100

| | |
|----------------------------------|----------|
| NaCl | 136,9 mM |
| EDTA | 0,5 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 8,1 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |

Trypsin

(Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)
1% in Aqua bidest.

William's Medium E (Biochrom, Berlin)

Danksagung

Nach Beendigung der Arbeit möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Müller für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte wissenschaftliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Mein herzlicher Dank auch für den unermüdlichen Einsatz und die Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit.

Frau Dr. Chmielewicz, Herrn Dr. Raue und Herrn Dr. Johne möchte ich für die Anregungen aus wissenschaftlichen Diskussionen danken.

Herrn Dr. Müller bin ich für seine großzügige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei den Fragen der FACS-Analyse dankbar.

Bei Frau Lüken bedanke ich mich ganz herzlich für die gute und freundliche Zusammenarbeit und für die mir in dieser Zeit erwiesene Hilfe. Auch für die Freundschaft, die nicht nur in der „Arbeitszeit“ zu sehen war, möchte ich danken.

Frau Freter, Frau Laner, Herrn Böttner und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Virologie bin ich für ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft dankbar.